



## รายงานการวิจัย

โครงสร้างและหน้าที่ของโดเมนจับไคตินของแฟมิลี 18 ไคตินเนส  
จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

Structure and function of the chitin binding domain of a  
family-18 chitinase from the bacterium *Vibrio harveyi*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

โครงสร้างและหน้าที่ของโดเมนจับไคตินของแฟมิลี 18 ไคติเนส  
จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

Structure and function of the chitin binding domain of a  
family-18 chitinase from the bacterium *Vibrio harveyi*

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2559

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ  
ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการ  
วิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

21 มิถุนายน พ.ศ. 2559

## บทคัดย่อ

ในการศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาหน้าที่ของโดเมนจับไคตินที่ปลายเอ็นของเอ็นไซม์ไคตินเนส เอ ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *ChBD* ขนาด 372 bp ที่ถอดรหัสให้โดเมนจับไคตินเรียกว่า  $ChBD_{VhChiA}$  ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 124 ตัว เข้าไปในพลาสมิด pETBlue-1 ได้เป็นผลสำเร็จ หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETBlue-1/ $ChBD_{VhChiA}$  เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21Turner (DE3)pLacI พบว่าเซลล์ *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ปริมาณมาก หลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีสองขั้นตอนคือ Ni-NTA affinity chromatography ตามด้วย gel filtration chromatography ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ประมาณ 10 mg ต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ลิตร ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค CD spectroscopy และ FL spectroscopy พบว่า  $ChBD_{VhChiA}$  มีโครงสร้างทุติยภูมิหลักเป็น  $\beta$ -rich ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างสามมิติที่ได้รายงานไว้แล้วและ  $ChBD_{VhChiA}$  มีโครงสร้างที่เหมาะสม การศึกษาคุณสมบัติการจับกับไคตินและไคโตซานด้วยเทคนิค polysaccharide binding assay พบว่าเอ็นไซม์ *VhChiA* และ  $ChBD_{VhChiA}$  สามารถจับกับไคตินได้ทุกชนิดแต่ด้วยความสามารถในการจับที่ไม่เท่ากัน โดยเอ็นไซม์ทั้งโมเลกุลสามารถจับกับไคตินได้สูงกว่าโดเมนจับไคตินประมาณ 10 เท่า การที่  $ChBD_{VhChiA}$  จับกับไคโตซานได้น้อยมากแสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชัน N-acetamido ที่ตำแหน่ง C<sub>2</sub> ของวงแหวนน้ำตาล GlcNAc มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสัมพรรคภาพการจับ การวิเคราะห์ค่าคงที่การแตกตัวของการจับ ( $K_d$ ) แสดงสัมพรรคภาพของการจับของ  $ChBD_{VhChiA}$  จากมากไปน้อยดังนี้ colloidal  $\beta$  chitin > colloidal  $\alpha$  chitin > crystalline  $\beta$  chitin > crystalline  $\alpha$  chitin >> chitosan นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ด้วย 1H-15N HSQC NMR spectroscopy แสดงให้เห็นว่า  $ChBD_{VhChiA}$  ไม่มีสัมพรรคภาพต่อน้ำตาลสายสั้น โดยสรุปงานวิจัยครั้งนี้ได้ค้นพบว่า  $ChBD_{VhChiA}$  มีหน้าที่จับกับไคตินสายยาวและหมู่ฟังก์ชัน C<sub>2</sub>-N-acetamido บนหน่วยน้ำตาล GlcNAc เป็นตัวกำหนดสัมพรรคภาพในการจับของ  $ChBD_{VhChiA}$  กับสายไคติน

## ABSTRACT

In this study, we carried out functional characterization of the chitin binding domain of *Vibrio harveyi* chitinase A. The *ChBD* gene fragment of 327 bp encoded the chitin binding domain, namely ChBD<sub>VhChiA</sub>, with 124 amino acids was successfully cloned into pETBlue-1 expression vector. The construct pETBlue-1/*ChBD* was then transformed into *E. coli* BL21Turner(DE3)pLacI host cells. The transformed *E. coli* cells were shown to produce high level of the recombinant protein and after two-step purification using Ni-NTA affinity chromatography, followed by gel filtration chromatography, 10 mg of the purified protein per one liter of bacterial culture was obtained. Secondary structure analysis by CD spectroscopy and FL spectroscopy showed that the ChBD<sub>VhChiA</sub> domain is  $\beta$ -strand rich, corresponding to the 3D-structure reported previously and folded properly. Studies of binding properties using polysaccharide binding assay showed that both VhChiA and ChBD<sub>VhChiA</sub> bound to all tested chitin, but with different binding capacities. The intact enzyme exhibited the binding activity about 10 fold greater than that of the truncated domain. The ChBD<sub>VhChiA</sub> showed slight binding activity against chitosan, which reflected that the functional C<sub>2</sub>-N-acetamido groups on the GlcNAc rings are crucial for the binding affinity of this domain. Analysis of the binding dissociation constant ( $K_d$ ) indicated the strength of the binding affinity of ChBD<sub>VhChiA</sub> following the order: colloidal  $\beta$  chitin > colloidal  $\alpha$  chitin > crystalline  $\beta$  chitin > crystalline  $\alpha$  chitin >> chitosan. In addition, the analytical results obtained from 1H-15N HSQC NMR spectroscopy showed that ChBD<sub>VhChiA</sub> had not affinity towards short-chain sugars. In conclusion, this research uncovered the physiological function of the chitin binding domain of VhChiA to be responsible for interacting with long-chain chitin and the C<sub>2</sub>-N-acetamido functionality on the GlcNAc units determines the affinity of binding between the ChBD<sub>VhChiA</sub> domain and the chitin chain.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	6
ประโยชน์ที่รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	10
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	19
ข้อเสนอแนะ	19
บรรณานุกรม	20
ภาคผนวก	
ก ผลงานเผยแพร่	23
ข ประวัติผู้วิจัย	24



## สารบัญญภาพ

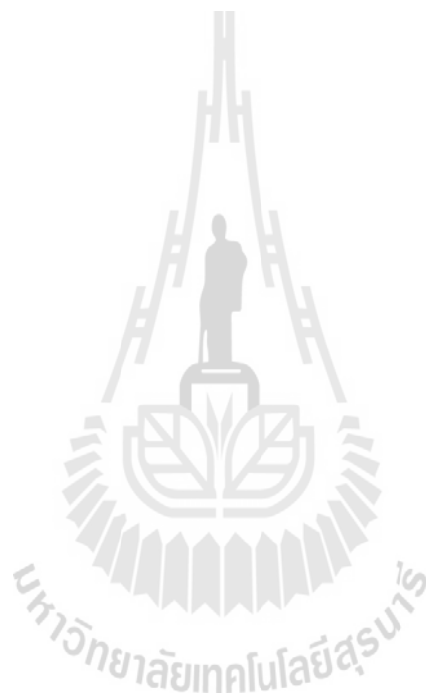
	หน้า
รูปที่ 1.1 วิธีการสลายการใช้ไคตินโดยแบคทีเรีย	2
รูปที่ 1.2 โครงสร้างสามมิติของ VhChiA	4
รูปที่ 1.3 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคตินเนส เอ จากแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณด้านนอกโมเลกุลของไคตินเนส	5
รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของเอ็นไซม์ VhChiA	10
รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการโคลนชิ้นส่วนของยีน <i>ChBD</i> เข้าไปใน pETBlue-1 expression vector	11
รูปที่ 3.3 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR product ของ $ChBD_{VhChiA}$	12
รูปที่ 3.4 การทำบริสุทธิ์โดเมนจับไคติน $ChBD_{VhChiA}$	13
รูปที่ 3.5 สเปกตรัมของ $ChBD_{VhChiA}$ ที่วิเคราะห์ด้วย circular dichroism (CD) spectroscopy	13
รูปที่ 3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิด้วยวิธี FL spectroscopy	14
รูปที่ 3.7 การจับกับไคตินและไคโตซานของ VhChiA และ $ChBD_{VhChiA}$	15
รูปที่ 3.8 กราฟแสดงผลของ pH ต่อความสามารถในการจับของ VhChiA และ $ChBD_{VhChiA}$ กับ colloidal $\beta$ -chitin	16
รูปที่ 3.9 รูปแสดงการจับของ $ChBD_{VhChiA}$ กับไคตินชนิดต่าง ๆ และไคโตซาน	16
รูปที่ 3.10 แผนภาพแสดงสเปกตรัมของ $^1H$ - $^{15}N$ $ChBD_{VhChiA}$ ที่ซ้อนทับกับสเปกตรัมของ $^1H$ - $^{15}N$ $ChBD_{VhChiA}/(GlcNAc)_5$ complex	18

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ค่าจลนพลศาสตร์ของการจับของ  $\text{ChBD}_{\text{VhChiA}}$  กับโคตินและโคโตซาน

17



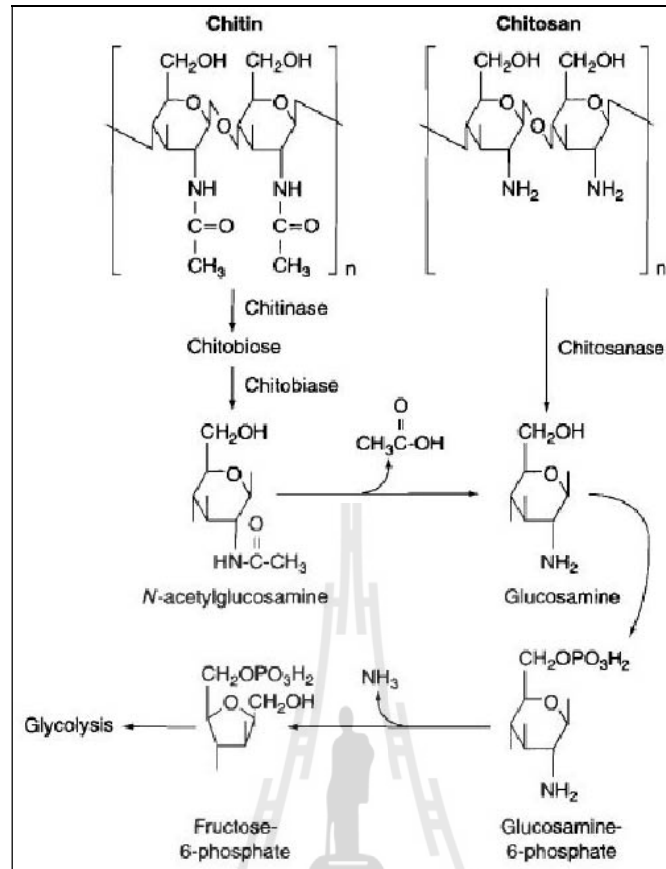


# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ของ *N*-acetyl glucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\beta 1 \rightarrow 4$  ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างภายนอกของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ในธรรมชาติพบไคตินปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลส โดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่ถูกสร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตในโลกนี้มีมากถึง 1 หมื่นล้านตันต่อปี (Gooday, 1994) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตรกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้นไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่น อาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ก่อให้เกิดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะที่การย่อยสลายไคตินโดยใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิบัติการเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิบัติการย่อยสลาย ในธรรมชาติไคตินถูกย่อยสลายด้วย chitinolytic bacteria โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้หลั่งเอนไซม์ไคตินเนส (EC3.2.1.14) ออกมาย่อยไคตินให้เป็นน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้นๆ ซึ่งจะถูกลดต่อไปจนได้ผลิตผลสุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เรียกว่าโคโตไบโอสหรือ (GlcNAc)<sub>2</sub> ที่จะถูกส่งเข้าสู่เซลล์ผ่านช่องที่ผนังเซลล์ที่เรียกว่าโคโตพอริน ขั้นตอนต่อมาแบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์เอนอะซิติลกลูโคซามิเนส (EC 3.2.1.52) ใน periplasm มาย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือเอนอะซิติลกลูโคซามีนหรือ (GlcNAc) ซึ่งจะถูกลดให้เป็นกลูโคซามีนโดยปฏิกิริยา deacetylation โดยเอนไซม์ deacetylase น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนี้นี้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วถูกเปลี่ยนเป็นรูป glucosamine-phosphate และถูกเมทาบอลไลท์ต่อไปในวิถีไกลโคไลซิสของแบคทีเรียแล้วสร้างเป็นพลังงาน ATP ในกับเซลล์ รูปที่ 1.1 แสดงวิธีการสลายไคตินที่ต้องการเอนไซม์ไคตินเนสและโคโตไบโอส



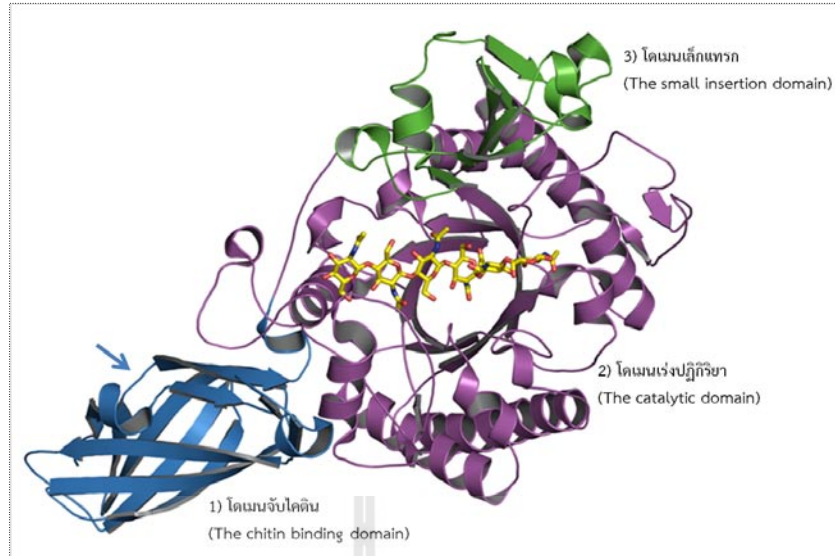
รูปที่ 1.1 วิธีการสลายการใช้ไคตินโดยแบคทีเรีย (แหล่งที่มา: Sylvia et al., 2005)

ตามหลักเกณฑ์ที่เสนอโดย Henrissat (Henrissat & Bairoch, 1993) ที่อาศัยความใกล้เคียงของลำดับของกรดอะมิโนเป็นหลัก ได้จำแนกเอ็นไซม์ไคติเนสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) ไคติเนสแฟมิลี 18 พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่แบคทีเรีย ไปจนถึงพืชและสัตว์ เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้โครงสร้างหลักคือมีบริเวณเร่งประกอบด้วย 2 motifs มาประกอบเป็นโดเมนเร่งปฏิกิริยาที่เรียกว่า  $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel domain และมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ 'substrate-assisted' mechanism (Papanikolau et al., 2001; Bortone, et al., 2002; Sasaki et al., 2002) และ (2) ไคติเนสแฟมิลี 19 พบเฉพาะในพืชและแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptomyces spp.* (Cohen-Kupiec & Chet 1998; Ohno et al., 1996) ลักษณะของเอ็นไซม์ไคติเนสในกลุ่มนี้คือมีบริเวณเร่งเป็นแบบ bilobal  $\alpha+\beta$  folding motif และมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ 'inversion hydrolytic' mechanism (Robertus & Monzingo, 1999)

เชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) แฟมิลี *Vibrionaceae* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส เอ ซึ่งเป็นสมาชิกของไคติเนสแฟมิลี 18 ในปริมาณมาก แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตและหลั่งเอ็นไซม์ออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบของเศษซากทับถมจากเปลือกกุ้ง เปลือกปู สาหร่าย และไดอะตอม เป็นต้น แล้วสร้างเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เป็นแหล่งพลังงานหลักให้กับเซลล์แบคทีเรียเอง

(Yu et al. 1991; Montgomery & Kirchman, 1993; Bassler et al., 1991) ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้ถือว่าเป็นแหล่งเอ็นไซม์ไคตินเนสที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของกากไคตินได้เป็นอย่างดี มีงานวิจัยหลายชิ้นรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและชีววิทยาเชิงโมเลกุลและองค์ประกอบของยีนไคตินเนสในแบคทีเรีย (Watanabe et al., 1990) และมีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ไคตินเนส เอ ในแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น *Serratia marcescens* (Perraki et al., 1994) และ *Bacillus circulans* (Watanabe et al., 2001) การรู้โครงสร้างสามมิติทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของเอ็นไซม์โดยละเอียดและเป็นแนวทางในการกลายพันธุ์เอ็นไซม์ให้ได้โมเลกุลใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา (Wang et al., 1997; Lorito et al., 1998) การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย ให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ และทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลผลิตจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และการเกษตร

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยค้นพบเชื้อแบคทีเรียในทะเลสาบสายพันธุ์ *V. carchariae* (ต่อมาได้มีการจำแนกเชื้อนี้เป็น *V. harveyi*) ที่ผลิตเอ็นไซม์ไคตินเนส เอ เรียกว่า VhChiA ในปริมาณมาก (Suginta et al., 2000; Suginta, 2007) การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่พบว่าเอ็นไซม์นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63 kDa เอ็นไซม์ VhChiA มีลักษณะเป็นเอ็นโดไคตินเนสโดยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในสายไคตินโพลีเมอร์ให้ได้ผลผลิตคือโคโตโอลิโกเมอร์ที่มีความยาวตั้งแต่ 2-6 หน่วยและผลผลิตของการย่อยสุดท้ายคือโคโตไบโอส จากการศึกษาคุณสมบัติทางจุลศาสตร์ของเอ็นไซม์พบว่ามีสัมพรรคภาพ (affinity) ต่อโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายยาวเนื่องจากบริเวณเร่งของเอ็นไซม์มีบริเวณจับกับน้ำตาล GlcNAc ได้หกหน่วยย่อย (Suginta et al., 2005) ส่วนการศึกษาทางโครงสร้างพบว่าเอ็นไซม์ *V. harveyi* chitinase มีโครงสร้างคล้ายไคตินเนสจาก *Serratia marcescens* (SmChiA) (Perrakis et al., 1994; Songsiririthigul et al., 2008) ที่ประกอบด้วย 1) โดเมนจับไคติน (ChBD) ที่ด้านปลาย N-terminus มีลักษณะเป็น  $\beta$ -rich fold (กรดอะมิโนที่ 22-138) ต่อด้วย hinge ตั้งแต่กรดอะมิโน 139-159 ที่เชื่อมกับโดเมนที่ 2 คือ โดเมนเร่งปฏิกิริยา (CatD) ที่มีลักษณะเป็น  $(\alpha/\beta)_8$  TIM barrel ที่ประกอบด้วยสายบีต้า 8 สาย (B1-B8) และเกลียวอัลฟาอีก 8 สาย (A1-A8) โดเมนนี้แยกออกเป็นสองส่วนคือ CatI (กรดอะมิโนที่ 548-588) และ CatII (160-460) โดย CatI และ CatII ถูกแทรกด้วยโดเมนเล็กที่ประกอบด้วย  $\alpha+\beta$  fold (กรดอะมิโนที่ 461-547) ส่วนบริเวณเร่งมีตำแหน่งที่ conserve ที่เรียกว่า DxxDxDxE motif โดยมีกรดอะมิโนเร่งปฏิกิริยาชื่อ Glu315 อยู่ที่ตำแหน่งท้ายสุดของ motif นี้ โครงสร้างสามมิติของ VhChiA แสดงในรูปที่ 1.2

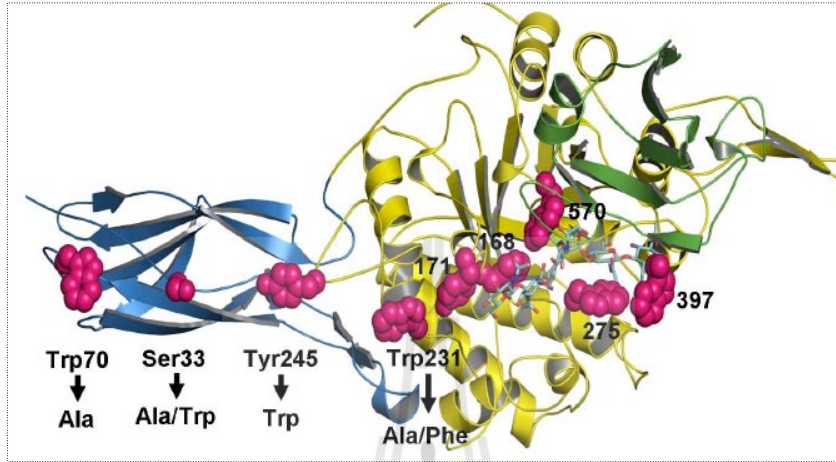


รูปที่ 1.2 โครงสร้างสามมิติของ VhChiA (Songsiriritthigul et al., 2008)

การศึกษาโครงสร้างเชิงซ้อนของ VhChiA กลายพันธุ์ E315M กับน้ำตาลโคไโดเฮกซะโอสพบว่า น้ำตาลจับได้เต็มที่ในบริเวณเร่งโดยมีโครงสร้างแบบงอ ซึ่งอธิบายว่าบริเวณเร่งของเอ็นไซม์มีลักษณะเป็น ร่องยาวลึกและมีบริเวณจับกับน้ำตาลหกตำแหน่งคือ  $(-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)$  งานวิจัยที่เกี่ยวข้องจาก เอ็นไซม์ไคตินเนส เอ ของ *Serratia marcescens* (SmChiA) พบว่ากรดอะมิโนหลายตัวที่บริเวณเร่งของ เอ็นไซม์มีลักษณะ conserved และไม่มีซ้ำ ได้แก่ Tyr167, Tyr170, Tyr275, Phe396, Tyr418 และ Tyr539 จากโครงสร้างสามมิติของ SmChiA พบว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีทำหน้าที่จับกับสับสเตรท (Aronson et al., 2003) ส่วนงานวิจัยเกี่ยวกับ VhChiA ได้ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งคือ Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ให้ได้ single mutant 5 ตัวคือ W168G Y171G W275G W397F และ W570G มี double mutant 1 ตัว คือ W397F/W570G มี triple mutant 1 ตัวคือ W397F/W570G/W275G และมี quadruple mutant 1 ตัวคือ W397F/W570G/W275G/Y171G กรดอะมิโนเหล่านี้จัดเรียงอยู่ในบริเวณจับกับสับสเตรททั้งสิ้น (Suginta et al., 2007) การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของไคตินเนสกลายพันธุ์ พบว่ามีเอ็นไซม์ กลายพันธุ์ตัวเดียวคือ W397F ที่ให้ค่าแอกติวิตีที่สูงกว่าเอ็นไซม์ดั้งเดิมส่วนเอ็นไซม์กลายพันธุ์อื่นมีค่าแอกติวิตีลดลงอย่างมาก การวิเคราะห์หาน้ำตาลผลิตภัณฑ์สร้างขึ้นโดยวิธี TLC พบว่าเมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่งรีดิวซ์ Trp275 ถูกเปลี่ยนเป็น Gly และ Trp397 เปลี่ยนเป็น Phe ทำให้รูปแบบการสลายน้ำตาลสายสั้นเปลี่ยนไปอย่างสิ้นเชิงแสดงว่ากรดอะมิโนทั้งสองมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลโคไโดโอลิโกแซคคาไรด์

ได้มีการตั้งสมมติฐานว่าในรายงานวิจัยอื่น ๆ ว่าโดเมนจับไคติน (chitin binding domain, ChBD) ของไคตินเนสมีความสำคัญต่อการนำไคตินสายยาวเข้าสู่บริเวณเร่ง ดังนั้นโดเมนนี้น่าจะมีกรดอะมิโนที่ผิวที่ทำ

หน้าที่จับกับสายไคตินได้ (Hult et al., 2005; Imai et al., 2002; Sonsiriritthigul et al., 2008) งานวิจัยต่อมาของผู้วิจัยได้วิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ VhChiA เทียบกับเอ็นไซม์ SmChiA และ BcChiA1 พบว่ามีกรดอะมิโนที่ conserved ที่ผิวของโดเมน ChBD คือ Ser33 Trp70 Trp231 และ Tyr245 โดยที่กรดอะมิโน Trp70 จะอยู่นอกสุดและ Trp231 จะอยู่ด้านในสุดของโดเมนติดกับปลายด้านรีดิวซ์ (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคตินเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Ser33 Trp70 Trp231 และ Tyr245 ที่บริเวณด้านนอกโมเลกุลของไคตินเนส (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

การทดลองศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อการจับกับสับสเตรทโดยวิธี polysaccharide binding assay พบว่าเอ็นไซม์กลายพันธุ์ W70A จับกับ colloidal chitin ได้น้อยที่สุด ส่วนเอ็นไซม์ W231A จับไคตินได้มากที่สุดโดยเอ็นไซม์ที่ศึกษาทั้งหมดมีลำดับของการจับไคตินเมื่อเทียบกับไคตินเนสดั้งเดิมดังนี้คือ W231A>S33W >WT≅ W231F>S33A>Y245W>W70A ผลการทดลองการดังกล่าวได้ข้อสรุปว่า Trp70 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีบทบาทสำคัญต่อการจับกับไคตินสายยาว ส่วนกรดอะมิโน Trp231 และ Tyr245 ซึ่งอยู่ใกล้กับโดเมนเร่งปฏิกิริยาช่วยในการสลายแต่ไม่มีผลต่อการจับกับไคตินสายยาว

## 1.2.วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทำการโคลน ทำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์ของโดเมนจับไคตินรูปธรรมชาติของแฟมิลี-18 ไคตินเนสของ *V. harveyi* ในระบบ *E. coli*
2. เพื่อศึกษาหน้าที่ในการจับไคตินของโดเมนจับไคตินรูปธรรมชาติ
3. เพื่อศึกษาโครงสร้างของโดเมนจับไคตินรูปธรรมชาติโดยวิธี CD/FL spectroscopy

### 1.3.ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มต้นด้วยการโคลนยีนดีเอ็นเอที่สร้างโดเมนจับโคตินจากเอ็นไซม์โคตินเนส ของแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยเทคนิค PCR เข้าสู่ expression vector ชนิดต่าง ๆ เช่น pET series หรือ pQE series แล้วทำการแสดงออกของโดเมนจับโคตินใน *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสม หลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องของยีนดีเอ็นเอที่โคลนได้แล้ว การทดลองในขั้นตอนต่อมาคือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีนเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณมาก ๆ หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี ในขั้นตอนสุดท้ายคือการศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของการจับกับโคตินและโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรต์โดยเทคนิค polysaccharide binding assay และการหาโครงสร้างทุติยภูมิของโดเมนจับโคตินโดยวิธี CD/FL spectroscopy

### 1.4.ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการวิจัยเนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน ผลงานวิจัยสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติและเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์หรือการบรรยายในที่ประชุมระดับชาติได้
2. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดค่อนข้างมากในสถาบันการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศไทย
3. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยสอดคล้องกับแนวทางการพัฒนากระบวนการสลายโคตินโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งมุ่งเป้าไปยังกระบวนการผลิตที่มีให้คุณค่าทางการค้าสูง

#### หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานภาครัฐที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเกษตร เช่น กรมพัฒนาส่งเสริมการเกษตร
2. หน่วยงานภาคอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดมลภาวะที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม
3. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1. การโคลนยีน

ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีนที่ผลิตโดเมนจับโคตินของเอ็นไซม์โคติเนส เอ โดยวิธี PCR amplification โดยใช้ยีน *ChiA* ที่แยกออกมาได้จากเชื้อ *V. harveyi* ที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Pantoom et al., 2009) ยีนที่โคลนประกอบด้วยกรดอะมิโน histidine หกตัวตามด้วยกรดอะมิโน Ala22-His138 เรียกชิ้นส่วนของยีนที่โคลนว่า *ChBD<sub>VhChiA</sub>* ส่วน โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำ PCR มีลำดับดังนี้ 5'-ATGCACCATCACCATCACCATGCTCCAACCGCACCAAGTATCGATATG-3' สำหรับ forward primer และ reverse primer มีลำดับดังนี้ 5'-TTAGTGTGAGCCGTCTGTATCTG-3' นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือส่วนที่จะถูกสังเคราะห์เป็น hexahistidine tag หลังจากนั้นนำ PCR product มาเชื่อมโดยตรงเข้ากับพลาสมิด pETBlue-1 expression vector สร้างเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pETBlue-1/*ChBDV<sub>hChiA</sub>* แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ต่อจากนั้นทำการตรวจสอบว่ายีนที่โคลนเข้าไปถูกต้องหรือไม่โดยวิธี colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิม ต่อจากนั้นทำการสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกมาแล้วส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยวิธี automated DNA sequencing (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA) อีกครั้งหนึ่ง

#### 2.2. การศึกษาการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์โปรตีน

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการทดสอบว่ามีชิ้นของยีน *ChBD* ที่ถูกต้องมา transform เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 Turner (DE3)pLacI แล้วเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ประกอบด้วย LB และ 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ของ ampicillin (LB/Amp) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ 37°C วันต่อมาทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สมบูรณ์มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB/Amp ปริมาตร 10 mL เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ 37°C หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB/Amp ปริมาตร 4x500 mL โดยใช้อัตราส่วน 1:100 (เชื้อ:อาหารเลี้ยงเชื้อ) เลี้ยงเชื้อที่ 37 °C จนได้ OD<sub>600</sub> ประมาณ 0.6-1.0 ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยการเติม 1.0 mM isopropyl thio-beta-D-galactoside (IPTG) ที่ 20 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °C ทำการละลายเซลล์ด้วย 30 mL ของ solubilizing buffer (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) และ 1.0 mg/ml lysozyme) ต่อจากนั้นทำการสลายเซลล์ที่ 0-4 °C ด้วยเทคนิค ultrasonication (หัว probe ขนาด 1.5 cm; 50% duty cycle; ค่าความแรงของแอมปริจูด 30%; เวลา 30 s; 10 ครั้ง) แล้วปั่นแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 40 นาที นำส่วนใสที่ได้หลังการปั่น

มาผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะโดยใช้ Ni-NTA agarose resin เป็นตัวจับ หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM imidazole ตามด้วย 20 mM imidazole แล้วทำการชะเอาโปรตีนที่จับอยู่กับ Ni<sup>2+</sup> ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนมารวมกันแล้วทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเลือกขนาดโดยการผ่านตัวอย่างโปรตีนลงในคอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR column ที่ต่อกับเครื่อง AKTAPrime FPLC purifier system (GE Healthcare, Munich, Germany) หลังจากนั้นนำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วจึงทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีน ChBD<sub>VhChiA</sub> ขนาด 14 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (M, 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) เพื่อทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ทำการวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการวัดการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm (A<sub>280</sub>) แล้วนำโปรตีนมาศึกษาหรือเก็บที่ -80°C ใน 15% (w/v) กลีเซอรอล จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

### 2.3. การศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิโดยวิธี Circular dichroism (CD) spectroscopy

ทำการหา CD spectra ของโปรตีนที่ผลิตได้จากเครื่อง Jasco J-720 spectrometer ที่อุณหภูมิ 25°C ใช้ quartz cuvette ปริมาตร 700  $\mu$ L มี path length เท่ากับ 1 mm ทำการ scan หา CD spectrum ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-260 nm ความเข้มข้นของ ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่ใช้ 10  $\mu$ M ทำการ normalize CD spectra ของโปรตีนตัวอย่างด้วย CD spectrum ของ 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 แล้วแปลงข้อมูลดิบที่ได้ให้เป็นค่า mean residue molar ellipticity (MRE) โดยใช้สมการข้างล่าง

$$[\theta] = m^\circ / ([\text{protein}]M \cdot l \cdot n)$$

โดยที่  $[\theta]$  คือ MRE ในหน่วย deg·cm<sup>2</sup>/dmol ค่า  $n$  คือจำนวนของกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์ ค่า  $m^\circ$  คือค่า ellipticity ที่วัดได้ ค่า  $M$  คือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน และค่า  $l$  คือค่าระยะทางที่แสงผ่านในหน่วย centimeters จากชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้จะสร้างสายโพลีเพปไทด์ของโดเมน ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่มีจำนวนกรดอะมิโนทั้งหมด 124 ตัว

### 2.4. การศึกษาการเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนโดยวิธี Fluorescence (FL) spectrophotometry

ทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน ChBD<sub>VhChiA</sub> โดยวิธี fluorescence spectroscopy ด้วยเครื่อง LS-55 fluorescence spectrometer (Perkin-Elmer, Bangkok, Thailand) โดยใส่สารละลายโปรตีน ปริมาตร 500  $\mu$ L ที่ประกอบด้วย 14  $\mu$ g ของ ChBD<sub>VhChiA</sub> ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl pH 8.0 ลงใน quartz cuvette วัดหาการเปลี่ยนแปลงค่า intrinsic tryptophan fluorescence intensity โดยตั้งค่า excitation wavelength เป็น 295 nm และค่า emission wavelength ให้อยู่ในช่วง 300-500 nm ค่าความกว้างของ emission slit เท่ากับ 5 nm และตั้งค่าอุณหภูมิในการวัดเท่ากับ 25°C หลังจากนั้นนำสเปกตรัมของ native protein มาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของโปรตีนที่ทำให้เสียสภาพโดยการต้มที่



100 °C เป็นเวลา 10 นาทีหรือการเติม 8 M urea ทำการหักล้างค่า fluorescence intensity ของโปรตีน ทั้งชุดข้อมูลด้วยค่าของบัฟเฟอร์แล้ววิเคราะห์ผลการทดลอง

## 2.5. การทำ polysaccharide binding assay

ทำการทดลองศึกษาความสามารถในการจับของโดเมน ChBD<sub>VhChiA</sub> กับไคตินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ colloidal  $\alpha$  chitin, colloidal  $\beta$ -chitin, crystalline  $\alpha$  chitin, crystalline  $\beta$ -chitin และ crystalline chitosan โดยเปรียบเทียบผลการทดลองกับเอ็นไซม์ VhChiA ตั้งเดิม ในปฏิริยาปริมาตร 500  $\mu$ L ประกอบด้วย 10% (w/v) chitin และ 5  $\mu$ g VhChiA หรือ 50  $\mu$ g ChBD<sub>VhChiA</sub> ในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM sodium acetate, pH 5.0 ทำการบ่มปฏิริยาที่ 0°C ในกระตักน้ำแข็งพร้อมกับการเขย่าที่ 700 rpm เมื่อเวลาผ่านไปที่ 0, 2.5, 5, 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที ทำการปั่นเก็บตะกอนที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์ที่จับกับไคติน (chitin-bound enzyme หรือ E<sub>b</sub>) โดยใช้ความเร็วในการปั่นที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° และเวลา 10 นาที และส่วนใสเป็นส่วนของเอ็นไซม์ที่ไม่จับกับไคติน (free enzyme หรือ E<sub>f</sub>) ทำการหาความเข้มข้นของเอ็นไซม์ในส่วน E<sub>f</sub> ด้วยวิธีของ Bradford (1976) ส่วนการทดลองหาค่า binding isotherm ทำการทดลองเหมือนข้างบนแต่ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนในปฏิริยาต่างกันตั้งแต่ 0-5  $\mu$ M

## 2.6. การศึกษาผลของ pH ต่อปฏิริยาการจับกับไคตินสายยาว

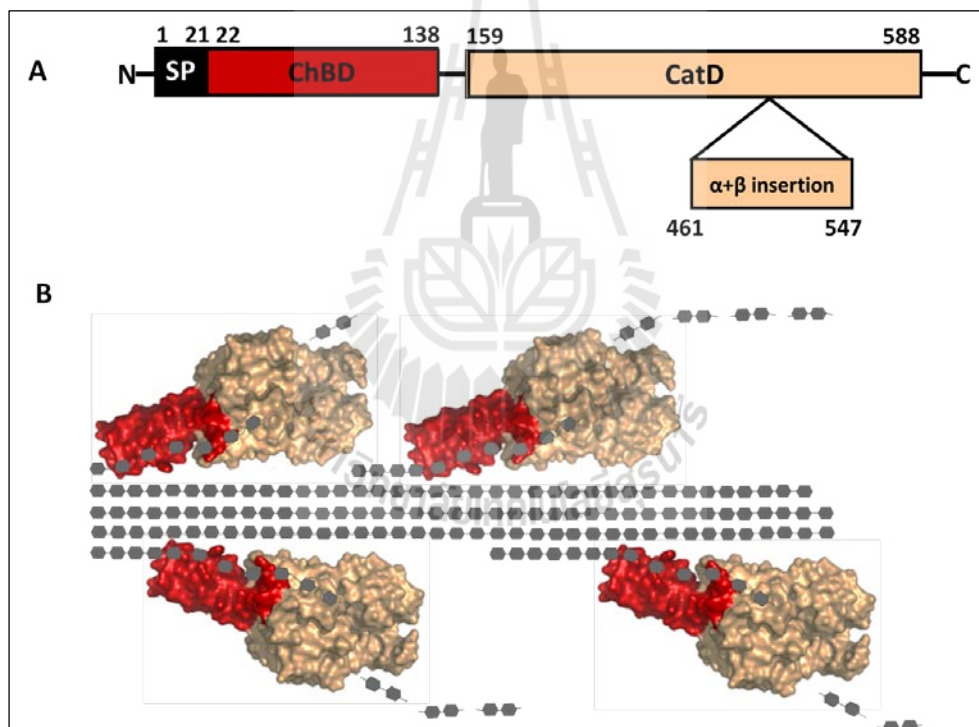
ปฏิริยาปริมาตร 500  $\mu$ L ประกอบด้วย 10% (w/v) colloidal  $\beta$ -chitin และ 5  $\mu$ g ของ VhChiA หรือ 50  $\mu$ g ของ ChBD<sub>VhChiA</sub> ใน citric acid/sodium phosphate buffer โดยปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 3-8 ทำการบ่มปฏิริยาบนน้ำแข็ง และเขย่าให้เข้ากันด้วยความแรง 700 rpm เป็นเวลา 1h หลังจากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm นำส่วนใสมาวัดหาปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในแต่ละค่า pH ที่ทดสอบ

## บทที่ 3

### ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

#### 3.1. การวิเคราะห์โครงสร้างของเอ็นไซม์

ในขั้นตอนแรกทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสายโพลีเปปไทด์ที่สร้างจากยีน *ChiA* ในจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio haveyi* พบว่าโปรตีนมีจำนวนกรดอะมิโนทั้งสิ้น 158 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 62.7 kDa (Suginta et al., 2004) ภายในสายโพลีเปปไทด์ประกอบด้วย 5 ส่วนคือ 1) signal sequence อยู่ด้านปลายเอ็น (กรดอะมิโนที่ 1-21); 2) โดเมนจับไคติน ChBD (กรดอะมิโนที่ 22-138); 3) ส่วนของ hint (กรดอะมิโนที่ 139-158); 4) โดเมนเร่งปฏิกิริยา CatD (กรดอะมิโนที่ 159-588); และ 5) โดเมนขนาดเล็ก หรือ  $\alpha+\beta$  small insertion domain ที่แทรกระหว่างกลางโดเมนเร่งปฏิกิริยา (กรดอะมิโนที่ 461-547) ดังแสดงในรูปที่ 3.1A



รูปที่ 3.1. การวิเคราะห์โครงสร้างของเอ็นไซม์ VhChiA

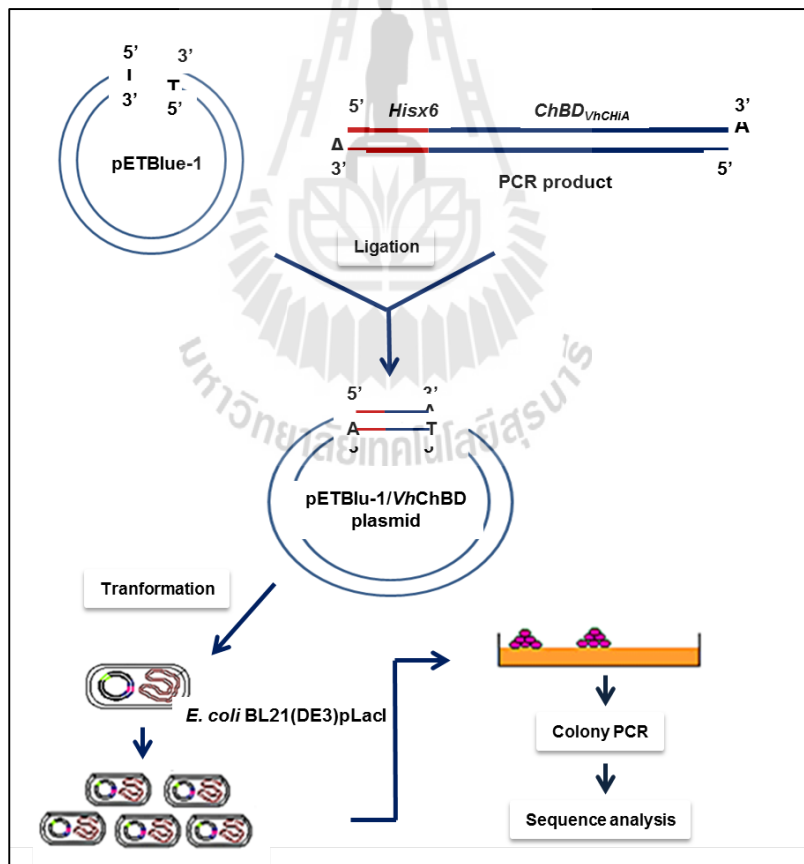
(A) โครงสร้างของยีน *ChiA* ประกอบด้วยส่วนที่ถอดรหัสเป็น signal peptide (SP) โดเมนจับไคติน (ChBD) โดเมนเร่งปฏิกิริยา (CatD) และโดเมนแทรก  $\alpha+\beta$  insertion

(B) แผนภาพแสดงการเคลื่อนตัวของเอ็นไซม์ VhChiA บนแผ่นไคตินและการนำไคตินสายเดี่ยวเข้าสู่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์

ส่วนรูปที่ 3.1B แสดงโครงสร้างสามมิติแบบผิว (surface representation) ของเอ็นไซม์ VhChiA จากรูปแสดงสมมติฐานการจับของเอ็นไซม์กับสายโคติน โดยโคตินสายเดี่ยวแตกออกมาแผ่นโคตินโดยเอ็นไซม์ lytic polysaccharide monooxygenase ทำการสลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดสายโคตินแต่ละสายเอาไว้ ซึ่งโมเลกุลของเอ็นไซม์ VhChiA จะใช้ส่วนของโดเมนจับโคตินเข้าจับกับโคตินสายยาวที่ตำแหน่งต่าง ๆ โดยปลายของสายโคตินจะถูกส่งจากด้านโดเมน ChBD<sub>VhChiA</sub> เข้าสู่บริเวณเร่งที่อยู่ในโดเมน CatD<sub>VhChiA</sub> แล้วเกิดการย่อยสลายให้ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือโคโตไบโอส (GlcNAc)<sub>2</sub>

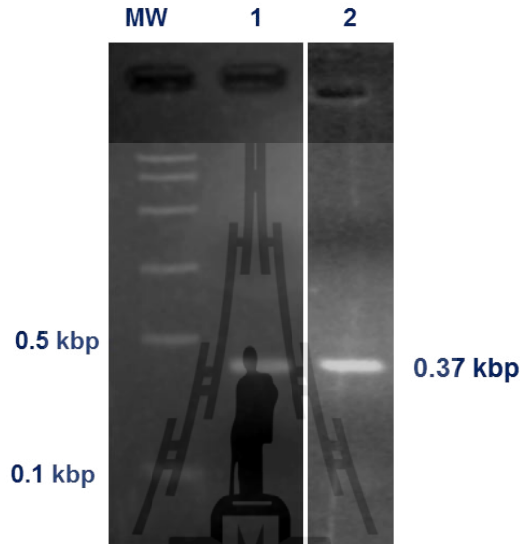
### 3.2. การออกแบบไพรเมอร์และการโคลนยีน

หลังจากวิเคราะห์โครงสร้างแล้ว ขั้นตอนต่อมาทำการออกแบบไพรเมอร์แล้วสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *ChBD* ขนาด 327 bp โดยเทคนิค PCR ชิ้นส่วนของยีนนี้สร้างโดเมน ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่มี hexahistidine tag ติดอยู่ที่ด้านปลายเอ็น รวมจำนวนกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์ทั้งหมดมี 124 ตัว แล้วนำชิ้นส่วนของยีนที่ได้โคลนเข้าสู่ pETBlue-1 expression vector ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการโคลนชิ้นส่วนของยีน *ChBD* เข้าไปใน pETBlue-1 expression vector

เมื่อทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *ChBD* เข้าไปใน pETBlue-1 expression vector แล้วทำการนำ construct ที่สร้างขึ้นใหม่ที่เรียกว่า pETBlue-1/*ChBD* เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* BL21 Turner (DE3)pLacI รูปที่ 3.3 แสดง PCR product ขนาด 0.37 kbp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR amplification (รูปที่ 3.3 ช่องที่ 1) หลังจากทำการโคลนยีนแล้วทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบหาชิ้นที่ได้ อีกครั้งได้ ผลการทำ colony PCR ให้ PCR product (รูปที่ 3.3 ช่องที่ 2) ขนาดเท่ากับชิ้นส่วนของยีนก่อนทำการโคลน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการโคลนยีนที่ต้องการเข้าไปและสร้าง pETBlue-1/*ChBD* ได้สำเร็จ

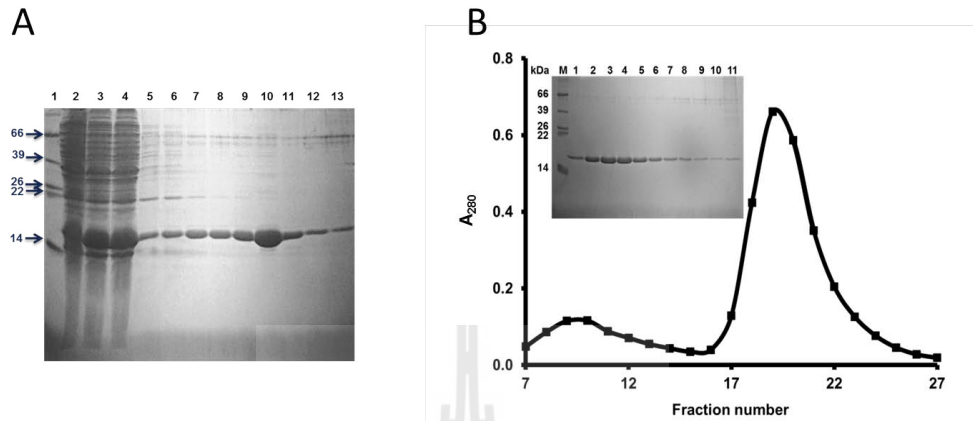


รูปที่ 3.3 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR product ของ  $ChBD_{VhChiA}$  ขนาด 0.37 kbp ช่องที่ (1) แสดง PCR product ที่ได้ก่อนทำการโคลนยีน และช่องที่ (2) แสดง PCR product ที่ได้จากการทำ PCR colony หลังการโคลนยีน

### 3.3. การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำบริสุทธิ์โปรตีน

เมื่อทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *ChBD* ที่สร้างโดเมนจับโคตินที่มีกรดอะมิโนทั้งสายจำนวน 124 ตัว พร้อมกับมีส่วนของ hexahistidine ( $His_6$ ) ติดอยู่ที่ปลายด้านเอ็น (N-terminus) แล้วศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21Turner(DE3)pLacI พบว่าเซลล์ *E. coli* สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ออกมาปริมาณมาก เมื่อทำการสลายเซลล์แล้วนำส่วน crude extract มาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดย Ni-NTA affinity chromatography ตามด้วยการทำบริสุทธิ์ครั้งที่สองด้วย gel filtration chromatography พบว่าโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์สองขั้นตอนมีความบริสุทธิ์มากกว่า 95% โดยสามารถผลิตโปรตีนได้ 10 mg ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร รูปที่ 3.4A แสดงการวิเคราะห์โปรตีน  $ChBD_{VhChiA}$  โดยวิธี SDS-PAGE หลังการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยการผ่าน Ni-NTA agarose affinity column โดยวิธี gravity flow ส่วนรูปที่ 3.4B แสดง chromatographic profile ของโปรตีน  $ChBD_{VhChiA}$  ที่ชะออกมาจากคอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR ที่ต่อกับ AKTAPrime FPLC purifier system

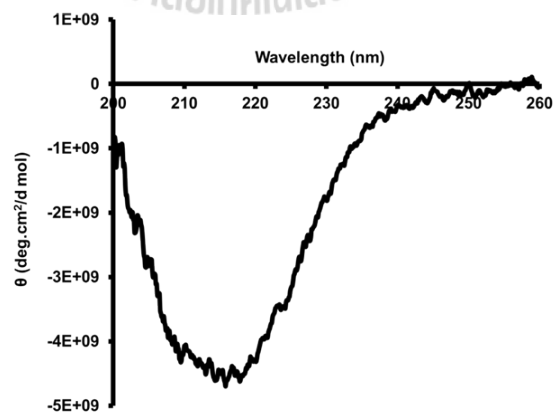
การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนเคลื่อนที่ไปบน SDS-PAGE gel มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากลำดับของกรดอะมิโนคือ 13.5 kDa



รูปที่ 3.4 การทำบริสุทธิ์โดเมนจับไคติน ChBD<sub>VhChiA</sub>

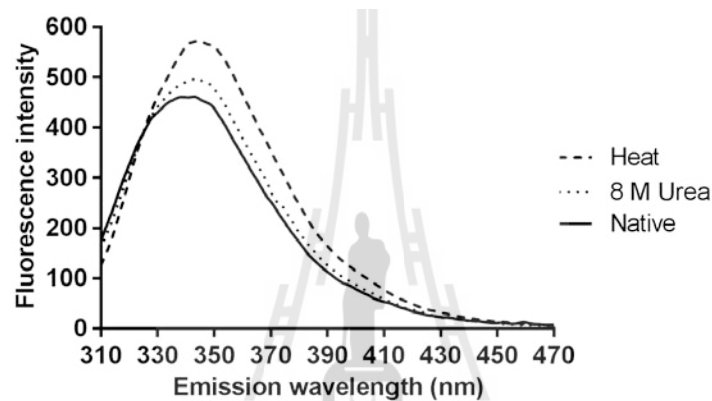
- A. SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ผ่าน Ni-NTA column และถูกชะด้วย 250 mM imidazole ช่องที่ 1: MW marker, 2: crude extract, 3 และ 4: unbound fractions, 5-13: eluted fractions
- B. การทำบริสุทธิ์โดเมนจับไคตินด้วยวิธี gel filtration chromatography ส่วนรูปภาพเล็กแสดง SDS-PAGE ของ peak ที่ดูดกลืนแสงที่ A<sub>280</sub> (ช่องที่ 1-11 คือ fraction ที่ 17-27)
- 3.4. การศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิและสถานภาพการม้วนพับของโปรตีน

หลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีนแล้วทำการตรวจสอบหาโครงสร้างทุติยภูมิของโดเมนจับไคตินด้วยเทคนิค CD spectroscopy ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 สเปกตรัมของ ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่วิเคราะห์ด้วย circular dichroism (CD) spectroscopy

ผลการทดลองแสดง CD spectrum ของโดเมนจับโคตินบริสุทธิ์โดยแสดงค่า negative ellipticity ที่ความยาวคลื่น 210-220 nm ซึ่งบ่งบอกว่า ChBD<sub>VhChiA</sub> ประกอบด้วยสายปี้ด้า ( $\beta$ -strand) เป็นหลักเมื่อเทียบกับ CD spectrum ของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนมาตรฐาน ([http://www.ap-lab.com/circular\\_dichroism.htm](http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm)) ซึ่งผลการทดสอบมีความสอดคล้องกับโครงสร้างสามมิติที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Songsirittthigul et al., 2008) ว่าโดเมนจับโคตินของเอ็นไซม์ VhChiA ประกอบด้วย  $\beta$ -rich fold เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธี fluorescence (FL) spectroscopy (รูปที่ 3.6) โดยตรวจหาค่า intrinsic fluorescence intensity ที่ปล่อยออกมาในช่วง emission wavelength ที่ 300-500 nm ทำการเปรียบเทียบ fluorescence spectrum ของโดเมนจับโคตินใน 3 สภาวะคือ สภาวะไม่เสียสภาพ สภาวะเสียสภาพด้วย 8M urea และสภาวะเสียสภาพด้วยความร้อน 100°C

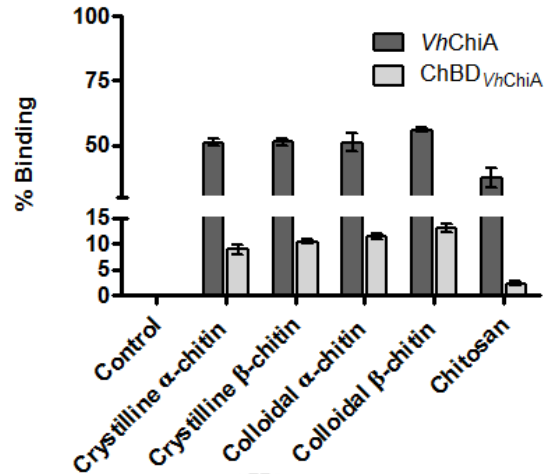


รูปที่ 3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิด้วยวิธี FL spectroscopy

ผลการทดลองแสดง ChBD<sub>VhChiA</sub> ในสภาพ native ให้ค่า fluorescence intensity สูงที่สุดที่ความยาวคลื่นที่ 340 nm แต่เมื่อทำให้เสียสภาพด้วย 8M urea และให้ความร้อน พบว่าค่า fluorescence intensity สูงขึ้นทั้งนี้เกิดจากโครงสร้างเสียสภาพมีการต่อะมิโน Trp ที่เคยฝังตัวด้านในโครงสร้างสามารถ expose ได้ นอกจากการเพิ่ม intensity แล้วยังพบว่าโครงสร้างเสียสภาพของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงค่า maximum emission wavelength ไปอยู่ที่ 345 nm อีกด้วย ผลการทดลองแสดงถึงความแตกต่างของโครงสร้าง native กับโครงสร้างเสียสภาพ ผลการทดลองที่ได้จาก CD และ FL ได้ข้อสรุปว่ารีคอมบิแนนท์ ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่ผลิตโดย *E. coli* มีโครงสร้างที่ถูกต้องกับรูปธรรมชาติ

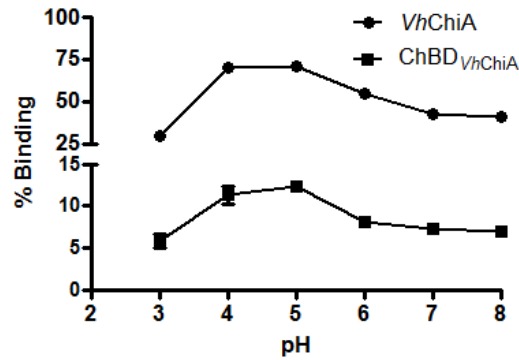
### 3.5. การศึกษาคุณสมบัติการจับกับโคตินและผลของ pH

การทดลองต่อมาคือการศึกษาคู่สมบัตินการจับกับโคตินและโคโตซานของ ChBD<sub>VhChiA</sub> โดยหลักการของ polysaccharide binding assay คือถ้าโปรตีนจับกับโคตินจะได้คอมเพล็กซ์ที่ตกตะกอนลงมาจาก การปั่นเหวี่ยง ส่วนโปรตีนที่ไม่จับกับโคตินจะล่องลอยอยู่ในส่วนใส ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบคุณสมบัติการจับของเอ็นไซม์ VhChiA กับของ ChBD<sub>VhChiA</sub> ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 การจับกับไคตินและไคโตซานของ VhChiA และ ChBD<sub>VhChiA</sub>

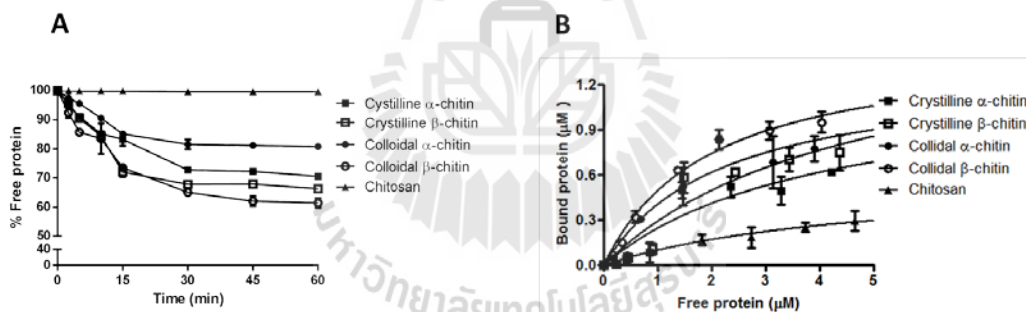
ผลการทดลองในรูปแบบข้างบนแสดงให้เห็นว่าทั้ง VhChiA และ ChBD<sub>VhChiA</sub> สามารถจับกับไคตินชนิดต่าง ๆ ได้ แต่ VhChiA แสดง %binding กับไคตินทุกชนิดสูงกว่า ChBD<sub>VhChiA</sub> ประมาณ 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจับกับไคตินชนิดต่าง ๆ พบว่า โปรตีนทั้งสองรูปสามารถจับกับไคตินได้แต่ให้ผลการจับดีกับ colloidal form มากกว่า crystalline form ทั้งนี้เป็นเพราะโครงสร้าง crystalline มีลักษณะ compact มากเมื่อเทียบกับโครงสร้าง colloidal ที่เป็นโครงสร้างหลวม ๆ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนที่ยึดวงแหวนน้ำตาล GlcNAc ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในสายโพลีแซคคาร์ไรต์ให้อยู่ในรูปเกลียวหรือแผ่นบีตัวถูกทำให้แตกออกด้วยกรด HCl นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดจับกับไคตินที่มีโครงสร้างแบบ  $\beta$  ได้ดีกว่าโครงสร้างแบบ  $\alpha$  ทั้งนี้โครงสร้างของ  $\alpha$ -chitin มีลักษณะแน่นมากกว่าโครงสร้างของ  $\beta$ -chitin ผลการทดลองที่แตกต่างกันคือ VhChiA สามารถจับกับไคโตซานได้ด้วย %binding ประมาณ 35% แต่โดเมน ChBD<sub>VhChiA</sub> จับกับไคโตซานได้น้อยมากด้วย %binding ประมาณ 2% การที่ %binding ลดลงอย่างมากเมื่อเปลี่ยนชนิดของโพลีแซคคาร์ไรต์จากไคตินเป็นไคโตซานแสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชัน  $C_2-NHC=OCH_3$  มีความสำคัญอย่างมากต่อสัมพรรคภาพในการจับของโดเมนจับไคติน เมื่อศึกษาผลของ pH ต่อความสามารถในการจับพบว่าช่วง pH ที่ให้ค่าการจับของทั้ง VhChiA และ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับ colloidal  $\beta$ -chitin อยู่ที่ pH 4-5 ถ้าค่า pH มากขึ้นหรือน้อยกว่าช่วง pH นี้จะทำให้ %binding ลดลง ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปแบบที่ 3.8 จากรูปแสดงให้เห็นว่า %binding ของ VhChiA สูงกว่าของ ChBD<sub>VhChiA</sub> ในทุกค่าของ pH ที่ทดสอบ



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงผลของ pH ต่อความสามารถในการจับของ VhChiA และ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับ colloidal  $\beta$ -chitin

### 3.6. การหาค่าคงที่การแตกตัวของการจับ (Equilibrium dissociation constant, $K_d$ )

การทดลองต่อมาทำการหาค่าคงที่การแตกตัวของการจับ (Equilibrium dissociation constant,  $K_d$ ) โดยวิธี Langmuir Binding Isotherm ในเบื้องต้นทำการหา %binding ที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลองในรูปที่ 3.8A แสดงปฏิกิริยาการจับไคตินเกิดขึ้น (สังเกตจากกราฟแสดง % free protein ลดลง) อย่างรวดเร็วในช่วง 15 นาทีแรก และอัตราการจับค่อย ๆ ลดลงและเข้าสู่สภาวะสมดุลภายใน 30-60 นาที



รูปที่ 3.9 รูปแสดงการจับของ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับไคตินชนิดต่าง ๆ และไคโตซาน

(A) ผลของการจับที่เวลาต่าง ๆ

(B) กราฟ equilibrium binding isotherm ของการจับ

จากรูปที่ 3.9A การลดลงของ free protein แสดงถึงการจับของ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับไคตินโพลีเมอร์ การทดลองพบว่า การจับเกิดขึ้นกับไคตินทุกชนิด ส่วนการทดสอบกับไคโตซานไม่เห็นการลดลงอย่างมีนัยในช่วงเวลาที่ศึกษา การทดลองส่วนที่สองทำปฏิกิริยาการจับระหว่างไคตินชนิดต่าง ๆ กับ ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 15 นาที อุณหภูมิ 0°C แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีน-ลิแกนด์ คอมเพล็กซ์จากสมการ [total protein] = [free protein] + [bound protein] กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง [bound protein] และ [free



protein] แสดงในรูปที่ 3.9B จากรูปจะเห็นว่ากราฟมีลักษณะ hyperbolic ซึ่งแสดงการจับแบบจำเพาะและมีความอิ่มตัวที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูง ๆ เมื่อ fit graph โดยใช้ non-linear one-site binding algorithm สามารถหาค่าสูงสุดของการจับหรือ binding capacity ( $B_{max}$ ) และค่าคงที่การแตกตัวของการจับหรือ equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) ดังที่สรุปไว้ในตารางที่ 3.1

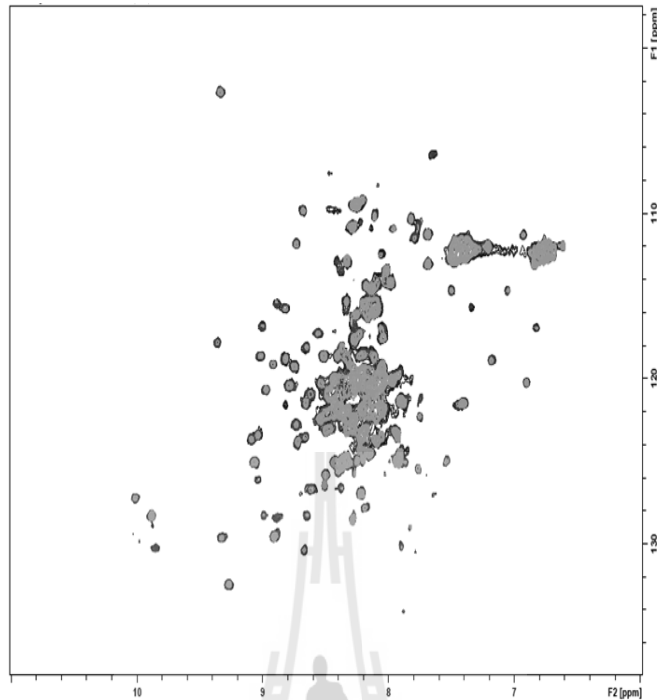
ตารางที่ 3.1 ค่าจลนพลศาสตร์ของการจับของ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับไคตินและไคโตซาน

Chitin substrates	$B_{max}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )
Crystalline $\alpha$ -chitin	$1.2 \pm 0.2$	$4.6 \pm 2.2$
Crystalline $\beta$ -chitin	$1.5 \pm 0.5$	$4.0 \pm 2.4$
Colloidal $\alpha$ -chitin	$1.3 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.9$
Colloidal $\beta$ -chitin	$1.7 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.3$
Chitosan	$1.0 \pm 0.2$	$16.0 \pm 2.4$

จากตารางจะเห็นว่า  $B_{max}$  ของ ChBD<sub>VhChiA</sub> มีค่าสูงที่สุดกับ colloidal  $\beta$  chitin ตามด้วย colloidal  $\alpha$  chitin crystalline  $\beta$  chitin และ  $\alpha$  chitin ตามลำดับ ส่วนไคโตซานให้ค่า  $B_{max}$  ต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาค่า  $K_d$  จะพบว่า มีค่าจากน้อยไปมากดังนี้ colloidal  $\beta$  chitin < colloidal  $\alpha$  chitin < crystalline  $\beta$  chitin < crystalline  $\alpha$  chitin << chitosan ผลการทดลองแสดงสัมพรรคภาพในการจับกับไคตินของโดเมน ChBD<sub>VhChiA</sub> จากมากไปน้อยตามลำดับ โดยโปรตีนแสดงสัมพรรคภาพสูงที่สุดกับ crystalline  $\beta$  chitin และสัมพรรคภาพต่ำสุดกับ chitosan ผลการวิเคราะห์สัมพรรคภาพการจับโดยพิจารณาค่า  $K_d$  มีความสอดคล้องกับค่า %binding จากการทดลองที่ได้จาก polysaccharide binding assay

### 3.7. การศึกษาการจับกับน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคารไรด์ด้วยเทคนิค $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NMR spectroscopy

ผลการทดลองที่ได้จาก polysaccharide binding assay และ Langmuir binding isotherm แสดงความจำเพาะในการจับของ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับไคตินสายยาว เพื่อเป็นการทดสอบความสามารถในการจับของ ChBD<sub>VhChiA</sub> กับน้ำตาลสายสั้น ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectroscopy ในการตรวจหาค่าการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของสัญญาณ (chemical shift) เทียบกับระหว่างสเปคตรัมของ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ChBD<sub>VhChiA</sub> กับสเปคตรัมของ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ChBD<sub>VhChiA</sub>/GlcNAc)<sub>5</sub> complex ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 แผนภาพแสดงสเปกตรัมของ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ChBD<sub>VhChiA</sub> ที่ซ้อนทับกับสเปกตรัมของ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ChBD<sub>VhChiA</sub>/(GlcNAc)<sub>5</sub> complex จากเทคนิค  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectroscopy ในการทดลองทำการเตรียมโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM PBS, pH 7.0 และ 5% D<sub>2</sub>O

จากรูปแสดงสัญญาณที่ได้จากสเปกตรัมของ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ChBD<sub>VhChiA</sub>/(GlcNAc)<sub>5</sub> ซ้อนทับกับสัญญาณที่ได้จากสเปกตรัมของ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ChBD<sub>VhChiA</sub> เกือบสนิทโดยไม่มีการกระจายตัวหรือให้สัญญาณที่แตกต่างออกไป แสดงว่าไม่มีการจับกันของโดเมนจับโคตินกับน้ำตาลสายสั้น ผลการทดลองที่ได้ให้ข้อสรุปว่า ChBD<sub>VhChiA</sub> มีความจำเพาะต่อโคตินสายยาวเพียงอย่างเดียวแต่ไม่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับข้อเสนอก่อนหน้านี้โดย Watanabe et al (1990) และ Songsiriritthigul et al (2008) ว่าโดเมนจับโคตินของเอ็นไซม์โคตินเนสทำหน้าที่ส่งโคตินโพลีเมอร์ให้กับโดเมนเร่งปฏิกิริยาผ่านกลไกที่เรียกว่า 'Slide and Bend' และไม่จับกับน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (Pantoom et al, 2008)

## บทที่ 4

### บทสรุป

#### 4.1. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาหน้าที่ของโดเมนจับไคตินที่ปลายเอ็นของเอ็นไซม์ไคติเนส เอ ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *ChBD* ขนาด 372 bp ที่ถอดรหัสให้โดเมนจับไคติน เรียกว่า  $ChBD_{VhChiA}$  ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 124 ตัว เข้าไปในพลาสมิด pETBlue-1 ได้เป็นผลสำเร็จ หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETBlue-1/ $ChBD_{VhChiA}$  เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21Turner (DE3)pLacI พบว่าเซลล์ *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ปริมาณมาก หลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีสองขั้นตอนคือ Ni-NTA affinity chromatography ตามด้วย gel filtration chromatography ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ประมาณ 10 mg ต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ลิตร ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค CD spectroscopy และ FL spectroscopy พบว่า  $ChBD_{VhChiA}$  มีโครงสร้างทุติยภูมิหลักเป็น  $\beta$ -rich ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างสามมิติที่ศึกษาไว้และ  $ChBD_{VhChiA}$  มีโครงสร้างที่เหมาะสม

ผลการศึกษาคณสมบัติการจับกับไคตินและไคโตซานด้วยเทคนิค polysaccharide binding assay พบว่าเอ็นไซม์  $VhChiA$  และ  $ChBD_{VhChiA}$  สามารถจับกับไคตินได้ทุกชนิดแต่ด้วยความสามารถในการจับที่ไม่เท่ากัน โดยเอ็นไซม์ทั้งโมเลกุลสามารถจับกับไคตินได้สูงกว่าโดเมนจับไคตินประมาณ 10 เท่า การที่  $ChBD_{VhChiA}$  จับกับไคโตซานได้น้อยมากแสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชัน N-acetamido ( $NHC=OCH_3$ ) ที่ตำแหน่ง  $C_2$  ของวงแหวนน้ำตาล GlcNAc มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสัมพรรคภาพการจับ การวิเคราะห์ค่าคงที่การแตกตัวของการจับ ( $K_d$ ) แสดงสัมพรรคภาพของการจับของ  $ChBD_{VhChiA}$  จากมากไปน้อยดังนี้ colloidal  $\beta$  chitin > colloidal  $\alpha$  chitin > crystalline  $\beta$  chitin > crystalline  $\alpha$  chitin >> chitosan และผลการวิเคราะห์ด้วย 1H-15N HSQC NMR spectroscopy แสดงให้เห็นว่า  $ChBD_{VhChiA}$  ไม่มีสัมพรรคภาพต่อน้ำตาลสายสั้น โดยสรุปงานวิจัยครั้งนี้ได้ค้นพบว่า  $ChBD_{VhChiA}$  มีหน้าที่จับกับไคตินสายยาวและหมู่ฟังก์ชัน  $C_2$ -N-acetamido บนหน่วยน้ำตาล GlcNAc ทำหน้าที่กำหนดสัมพรรคภาพในการจับของ  $ChBD_{VhChiA}$  กับไคติน

#### 4.2. ข้อเสนอแนะ

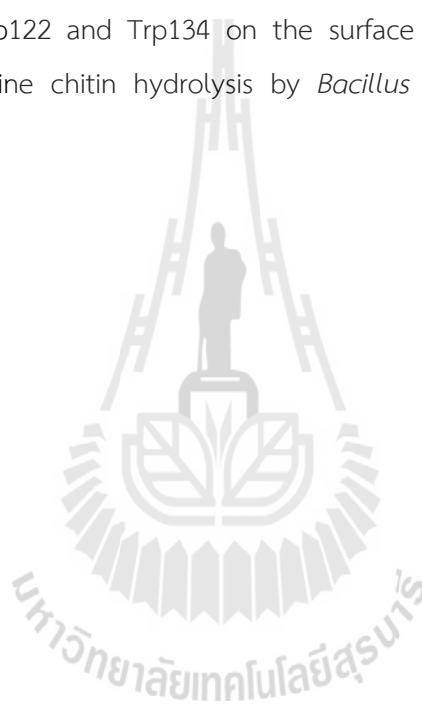
ไม่มี

## บรรณานุกรม

- Aronson NN Jr, Halloran BA, Alexyev MF, Amable L, Madura JD, Pasupulati L, Worth C & van Roey P (2003). Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. *Biochem. J.* 376, 87-95.
- Bortone K, Monzingo AF, Ernst S & Robertus JD (2002). The structure of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate-assisted mechanism. *J Mol Biol.* 320:293-302.
- Bassler BL, Yu C, Lee YC & Roseman S (1991). Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J Biol Chem.* 266:24276-24286.
- Bradford, M.M. (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Cohen-Kupiec R & Chet I (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol.* 9:270-277
- Gooday GW (1994). In *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312.
- Henrissat B & Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293:781-788.
- Hult EL, Katouno F, Uchiyama T, Watanabe T & Sugiyama J (2005). Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170. *Biochem. J.* 388:851-856.
- Imai T, Watanabe T, Yui T & Sugiyama J (2002). Directional degradation of beta-chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique. *FEBS Lett.* 510:201-205.
- Lorito M, Woo SL, Garcia I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S & Scala F (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7860-7865.
- Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M & Watanabe T (1996). A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol.* 178:5065-5070.

- Montgomery MT & Kirchman DL (1993). Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl Environ Microbiol* 59:373-379.
- Papanikolaou Y, Prag G, Tavlas G, Vorgias CE, Oppenheim AB & Petratos K (2001). High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry* 40, 11338–11343.
- Pantoom S, Songsirittthigul C & Suginta W (2008). The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC Biochem.* 9, 2.
- Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS & Vorgias CE (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169-1180.
- Robertus JD & Monzingo AF (1999). The structure and action of chitinases. *EXS.* 87:125-35. Review.
- Sasaki C, Yokoyama A, Itoh Y, Hashimoto M, Watanabe T & Fukamizo T (2002). Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. *J. Biochem (Tokyo)* 131, 557-564.
- Songsirittthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & Suginta W (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. *J Struct Biol.* 162, 491-499.
- Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG & Zuberer DA (2005). Principles and Applications of Soil Microbiology. 2nd edition, p 306.
- Suginta W, Robertson PA, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA (2000). Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84.
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsirittthigul C, Svasti J & Prinz H (2005). Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376-3386.
- Suginta W (2007). Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme MicrobTech.* 41, 212-220.
- Suginta, W., Songsirittthigul, C., Kobdaj, A., Opassiri, R. & Svasti, J. (2007). Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770, 1151-1160.
- Yu C, Lee AM, Bassler BL & Roseman S (1991). Chitin utilization by marine bacteria. A

- physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 266:24260-24267.
- Wang SH, Zheng HJ, Dissanayake S, Cheng WF, Tao ZH, Lin SZ & Piessens WF (1997). Evaluation of recombinant chitinase and SXP1 antigens as antimicrofilarial vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* 56:474-481.
- Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K & Tanaka H (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J Bacteriol.* 172: 4017-4022.
- Watanabe T, Ishibashi A, Ariga Y, Hashimoto M, Nikaidou N, Sugiyama J, Matsumoto T & Nonaka T (2001). Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1. *FEBS Letters* 494, 74-78.



## ภาคผนวก ก

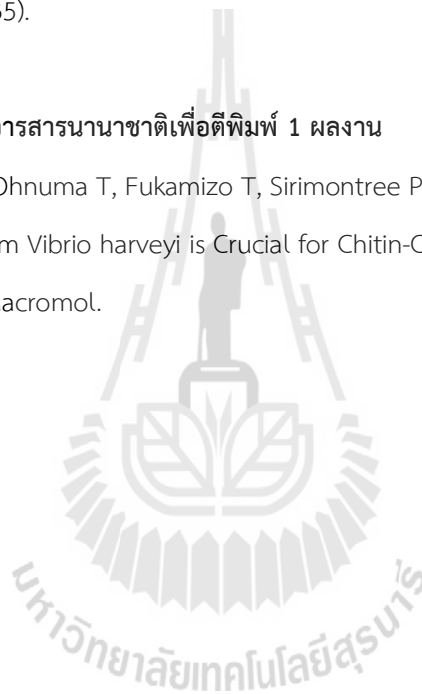
### ผลงานเผยแพร่

#### 1. ผลงานนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 1 ผลงาน

- Natchanok Sritho, Paknisa Sirimontree and **Wipa Suginta\***. Role of the chitin binding domain of chitinase A from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. The 7th AOHUPO congress and the 9th international symposium of the protein society of Thailand, August 6-8, 2014, Miracle grand convention hotel Bangkok, Thailand. Poster presentation, P103 (Abstract No. PP090-35).

#### 2. ผลงานที่รอพิจารณาจากวารสารนานาชาติเพื่อตีพิมพ์ 1 ผลงาน

- **Suginta W,\*** Sritho N, Ohnuma T, Fukamizo T, Sirimontree P, The Chitin-Binding Domain of a GH-18 Chitinase from *Vibrio harveyi* is Crucial for Chitin-Chitinase Interactions. Under review by Int J Biol Macromol.



## ภาคผนวก ข

### ประวัติผู้วิจัย

#### หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ** (ภาษาไทย) นาง วิภา นามสกุล สุจินต์  
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Wipa Suginta
2. **หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน** 3 2201 00491 912
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** รองศาสตราจารย์ ดร. ด้าน ชีวเคมี
4. **หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**  
หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ม.เทคโนโลยีสุรนารี  
อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 44 223968 โทรสาร 44 223195 e-mail wipa@sut.ac.th
5. **ประวัติการศึกษา**
  - 2541-2543 ปฏิบัติงานวิจัยหลังปริญญาเอก มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ
  - 2538-2541 ปริญญาตรีบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ
  - 2533-2536 ปริญญามหาบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล
  - 2530-2533 ปริญญาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**  
ชีวเคมีของเอ็นไซม์และโปรตีนที่เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ
- 7.3 **รางวัลผลงานวิจัยระดับชาติ/นานาชาติ**
  - 2014 “2014 Prof. MR. Jisnuson Svasti BMB Award” from The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King
  - 2013 “2013 TRF-CHE-Scopus Researcher Award” from The Thailand Research Fund
  - 2009-2012 “Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers” from The Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany.
  - 2010 “Outstanding Research Award” from Suranaree University of Technology.
  - 2006 Suranaree University of Technology Award for “Outstanding Academic Performance in Science”
  - 2005 “For Women in Science Fellowship” from L’OREAL/UNESCO Thailand.
  - 2003 “Visiting Scientist Fellowship” from the German Academic Exchange Service (DAAD), Germany.



- 1999-2000 “Wellcome Trust fellowship” for Postdoctoral Research Study at  
The Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.
- 1995-1999 “Royal Thai Government Ph.D. Scholarship” from the Royal Thai Government to carry  
out a Ph.D. study in United Kingdom.

#### 7.4 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Soysa HMS, **Suginta W\***. (2016) Identification and functional characterization of a novel OprD-like chitin uptake channel in non-chitonolytic bacteria. **J Biol Chem**. [Epub ahead of print].
2. Talabnin C\*, Jantavon P, Thongsom S, **Suginta W**, Talabnin K, Wongkham S. (2016) Ring finger protein 43 (RNF43) expression is associated with genetic alteration status and poor prognosis among patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Hum Pathol**. 52,47-54.
3. Thongsom S, Chaocharoen W, Silsirivanit A, Wongkham S, Sripa B, Choe H, **Suginta W\***, Talabnin C\*. (2016) YKL-40/Chitinase-3-Like-Protein-1 is Associated with Poor Prognosis and Promotes Cell Growth and Migration of Cholangiocarcinoma. **Tumor Biol**. [Epub ahead of print].
4. Meekrathok P, **Suginta W.\*** (2016) Probing the Catalytic Mechanism of *Vibrio harveyi* GH20  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase by Chemical Rescue. **PLoS One**. 11, e0149228.
5. Chaocharoen W, Ranok A, **Suginta W\***, Schulte A\* (2015) A microfluidic capacitive immunosensor system for human cartilage chitinase-3-like protein 2 (hYKL-39) quantification as an osteoarthritis marker in synovial joint fluid. **RSC Adv**. 5, 85410-85416.
6. Sirimontree P, Fukamizo T, **Suginta W\***. (2015) Azide anions inhibit GH-18 endochitinase and GH-20 Exo  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **J Biochem**. first published online September 1, 2015 doi:10.1093/jb/mvv087.
7. Chumjan W, Winterhalter M, Schulte A, Benz R, **Suginta W\***. (2015) Chitoporin from the Marine Bacterium *Vibrio harveyi*: Probing the Essential Roles of Trp136 at the Surface of the Constriction Zone. **J Biol Chem**. Jun 16. pii: jbc.M115.660530.
8. Meekrathok P, Bürger M, Porfetye AT, Vetter IR, **Suginta W\***. (2015) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a GH20  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**. 71:427-433.
9. Ranok A, Wongsantichon J, Robinson RC, **Suginta W\*** (2015) Structural and thermodynamic insights into chitooligosaccharide binding to human cartilage chitinase 3-Like Protein 2 (CHI3L2 or YKL-39). **J Biol Chem**, 290:2617-2629.

10. Theanponkrang S, **Suginta W**, Weingart H, Winterhalter M, Schulte A\* (2015) Robotic voltammetry with carbon nanotube-based sensors: A superb blend for convenient high-quality antimicrobial trace analysis. **Int J Nanomedicine**, 10:859-868.
11. Chaocharoen W, **Suginta W**, Ranok A, Limbut W, Numnuam A, Khunkaewla P, Kanatharana P, Thavarungkul P, Schulte A\* (2015) Electrochemical immunosensing of human YKL-40, a mammalian chitinase-like protein and disease marker. **Bioelectrochem**. 101:106-113.
12. Chotinantakul K, **Suginta W\***, Schulte Albert\* (2014) An Advanced amperometric respiration assay for antibiotic susceptibility testing. **Anal Chem**. 86:10315-10322.
13. Sirimontree P, **Suginta W\***, Sritho N, Kanda Y, Shinya S, Ohnuma T, and Fukamzo T\*. (2014) Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of a family GH18 chitinase. **Biosci Biotech Biochem**. 78:2014-2021.
14. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, **Suginta W\***. (2014) *BpsOmp38* porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. **PLoS One**. 9:e95918.
15. Ranok A, Khunkaewla P, **Suginta W\*** (2013) Human cartilage chitinase 3-like protein 2: Cloning, expression, production of polyclonal and monoclonal antibodies for osteoarthritis detection and identification of potential binding partners. **Monoclon Antib Immunodiagn Immunother (formerly Hybridoma)**. 32, 317-325.
16. **Suginta W**, Smith MF\* (2013) Single-molecule trapping dynamics of sugar-uptake channels in marine bacteria. **Phys Rev Lett**. 110, 238102.
17. **Suginta W**, Khunkaewla P, Schulte A\* (2013) Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. **Chem Rev**. 113, 5458-5479.
18. **Suginta W\***, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. **J Biol Chem**. 288, 11038-11046.
19. **Suginta W\***, Chumjan W, Mahendran KR, Janning P, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **PLoS One**. 8:e55126.
20. **Suginta W\***, Sritho N. (2012) Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. **Biosci Biotech Biochem**. 76, 2275-2281.
21. Sritho N & **Suginta W\*** (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. **App Biochem Biotech**. 166, 1192-1202.

22. Pantoom S, Vetter I\*, Prinz, H\*, **Suginta W\*** (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. **J Biol Chem.** 286, 24312-24323.
23. **Suginta W\***, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H\*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *BpsOmp38* from an ultrasensitive *Burkholderia pseudomallei* strain. **BBA-Biomembr.** 1808, 1552-1559.
24. **Suginta W\***, Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T (2010) Novel  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. **BMC Biochem.** 11:40. (Highly accessed)
25. Schulte A, Ruamchan S, Khunkaewla P, **Suginta W\*** (2009) The outer membrane protein VhOmp from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. **J Membr Biol.** 230, 101-111.
26. **Suginta W\***, Pantoom S, Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. **J Chem Biol.** 2, 191-202.
27. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, **Suginta W\*** (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. **J Struct Biol.** 162, 491-499.
28. Pantoom S, Songsiriritthigul C, **Suginta W\*** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. **BMC-Biochem.** 9:2.
29. **Suginta W\***, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. **BBA-General Subjects.** 1770, 1151-1160.
30. **Suginta W\*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme Microb Tech.** 41, 212-220.
31. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H, **Suginta W\*** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. **Acta Cryst. Section F.** 61, 895-898.
32. **Suginta W\***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. **FEBS J.** 272, 3376-3386.

33. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, **Suginta W\*** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. **Biochem J.** 384, 609–617.
34. **Suginta W\***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. **Arch Biochem Biophys.** 424, 171-180.
35. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, **Suginta W\*** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. **Biochem J.** 377, 579-587.
36. **Suginta W**, Karoulias N, Aitkin A, Ashley RH\* (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. **Biochem J.** 359, 55-64.
37. **Suginta W**, Robertson PAW, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA\* (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. **J Appl Microbiol.** 89, 76-84.
38. Svasti J\*, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S, Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In Protein Structure-Function Relationship (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
39. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E\* (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakhsisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
40. **Suginta W**, Svasti MRJ\* (1995) Purification and Properties of  $\beta$ -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. **J Sci Soc Thai.** 21, 183-186.
41. **Suginta W**, Svasti J\* (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakhsisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
42. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. **J Sci Soc Thai.** 21, 293-303.