



รายงานการวิจัย

การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก
Pyrococcus furiosus ในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
(Expression of Recombinant Thermostable DNA polymerase
enzyme from *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นัส

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นายอนันต์ศักดิ์ ลุนจันทา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2550

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินการวิจัย ไคร์ขอขอบคุณ Prof. Robert Robinson แห่ง Institute of Molecular and Cellular Biology ประเทศสิงคโปร์ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด pSY5, วัสดุอุปกรณ์ และครุภัณฑ์บางส่วนในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และการตกผลึกรีคอมบิแนนท์โปรตีน ข้อมูลเอ็กซ์เรย์ของผลึกโปรตีนได้จากการเก็บข้อมูล ณ beamline BL13B1 ณ National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC) Hsinchu ประเทศไต้หวัน โดยใช้ beam time ของ Prof. Robinson ขอขอบคุณ ดร.เศกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ ผู้ที่มีส่วนในการร่วมทำการวิจัยและผลักดันให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ รศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ ที่ช่วยชี้แนะและให้ความคิดเห็นในการทดลอง ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักวิจัยที่ยินดีเป็นหนูทดลองใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ที่ผลิตขึ้น ท้ายที่สุดผู้วิจัยไคร์ขอขอบคุณ ผศ.ดร.วิภา สุจินต์ และผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ประเมินโครงการทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจที่จะทำงานให้สำเร็จภายใต้กรอบของงบประมาณและเวลา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550 จากสภาวิจัยแห่งชาติ ผ่านมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กันยายน 2550

บทคัดย่อภาษาไทย

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสทนร้อนจาก *Pyrococcus furiosus* หรือ *Pfu* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส family B เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเติมเบสนิวคลีโอไทด์ในปฏิกิริยา PCR ได้แม่นยำที่สุดในสถานะที่มีอุณหภูมิสูง ในการศึกษากลไกและการควบคุมการเติมนิวคลีโอไทด์หรือความสามารถในการทนความร้อนสูงของเอนไซม์ในเชิงโครงสร้างโปรตีน จำเป็นจะต้องมีโครงสร้างของเอนไซม์นี้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาค้นคว้า พบว่ายังไม่มีการศึกษาเพื่อหาโครงสร้างของเอนไซม์นี้ โดยการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อ โคลน ผลิต ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ตกผลึก และนำเสนอข้อมูลทางด้านเอ็กซ์เรย์เบื้องต้นของเอนไซม์ *Pfu* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

ในผลการศึกษา ได้มีการโคลนยีนดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจากจีโนมของ *P. furiosus* เข้าสู่ pSY5 พลาสมิด และผลิตโปรตีนใน *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS ในรูปแบบที่เป็น His₆-tagged *Pfu* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส โดยมีความสามารถในการผลิต 38 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้มีการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งพบว่ามี relative activity 30,000 U ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และยังพบอีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตนี้ยังมีความคงทนต่อสภาพความร้อนที่ 97.5 °ซ เป็นเวลานานถึง 23 ชั่วโมง และมีความสามารถในการทำ PCR ได้สูงกว่าเอนไซม์ที่มีขายตามท้องตลาด อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ได้มีการสูญเสียความสามารถในการทำ PCR บ้างเมื่ออยู่ในสภาพความร้อนดังกล่าวข้างต้น

ในการตกผลึกโปรตีนนั้น ได้มีการกระบวนการทำแตกต่างกันสองกระบวนการ คือ ไม่มีการให้ความร้อนโปรตีนก่อนการตกผลึก และมีการให้ความร้อนก่อนการตกผลึก จากผลการศึกษาพบว่า โปรตีนชนิดนี้ได้ให้ความร้อนมีผลึกเดี่ยวเกิดขึ้นในสถานะที่มี 12% (w/v) PEG1000, 200 mM ammonium phosphate (monobasic) และสามารถหักเหเอ็กซ์เรย์ได้เพียงที่ 4 องศาเท่านั้น ส่วนโปรตีนชนิดนี้ให้ความร้อน ซึ่งมีผลึกเดี่ยวเกิดขึ้นในสถานะที่มี 10% w/v PEG8000, 100 mM sodium acetate, and 50 mM magnesium acetate สามารถหักเหเอ็กซ์เรย์ได้ที่ 3 องศา โดยมี unit-cell parameter เป็น $a = 91.9 \text{ \AA}$, $b = 126.8 \text{ \AA}$, $c = 88.4 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 109.1^\circ$, และ $\gamma = 90.0^\circ$ และเป็นผลึกชนิด monoclinic space group C2 โดยมี Matthew's coefficient เท่ากับ $2.64 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ และมี solvent content เท่ากับ 53.5% (v/v)

Abstract

The *Pyrococcus furiosus* thermostable DNA polymerase or *Pfu* DNA polymerase is structurally homologous to the family B DNA polymerases. It has been shown to have the highest fidelity, introducing the lowest amplification errors in PCR products. Nevertheless, the structure of *Pfu* DNA polymerase is unknown. Understanding of the structural mechanisms and control of its high fidelity, as well as its thermostability is therefore limited. The objectives of this study were to clone, express, and purify *Pfu* DNA polymerase, test its activity, crystallize it and generate the preliminary X-ray crystallographic data.

The DNA polymerase gene was cloned from *P. furiosus* genomic DNA into the pSY5 plasmid vector, and expressed in *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) pLYSS as the His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase with yield of 38 mg/L culture. The protein was purified and tested for its activity. The relative activity is 30,000 U/mg protein. The His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase was still stable when incubated at 97.5 °C for 23 h and has higher PCR efficiency than commercial *Pfu* DNA polymerase. Some loss of PCR efficiency occurred in the heat-treated protein.

Single crystals of non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase were obtained from a condition containing 12% (w/v) PEG1000, 200 mM ammonium phosphate (monobasic) and diffracted to a resolution limit of only 4 Å. On the other hand, single crystals of heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase were obtained from 10% w/v PEG8000, 100 mM sodium acetate, and 50 mM magnesium acetate. The crystal diffracted to a resolution limit of 3 Å. The unit-cell parameters were determined as $a = 91.9 \text{ \AA}$, $b = 126.8 \text{ \AA}$, $c = 88.4 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 109.1^\circ$, and $\gamma = 90.0^\circ$ with the monoclinic space group of C2, which gave Matthew's coefficient of $2.64 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ and a solvent content of 53.5% (v/v).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 วัสดุอุปกรณ์.....	4
2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย.....	4
2.1.2 พลาสมิดเวกเตอร์.....	4
2.1.3 เอนไซม์.....	4
2.1.4 ชุดอุปกรณ์และสารเคมีอื่น ๆ.....	4
2.2 เครื่องมือ.....	4
2.3 วิธีการทดลอง.....	5
2.3.1 การโคลนยีน DNA polymerase จาก <i>P. furiosus</i>	5
2.3.2 การผลิต (Expression) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₆ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ใน <i>E. coli</i>	6
2.3.3 การทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₆ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ (Purification).....	7
2.3.4 การวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์.....	8
2.3.5 การศึกษาความทนทานต่อความร้อน (Thermostability) ของรีคอมบิแนนท์ เอนไซม์ His ₆ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของรีคอมบิแนนท์ เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	9
2.3.7 การตกผลึก (Crystallization) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	10
2.3.8 การเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์ (Data collection) จากผลึกของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ - tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	11
บทที่ 3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	
3.1 การโคลนยีน DNA polymerase จาก <i>P. furiosus</i>	12
3.2 การผลิต (Expression) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ใน <i>E. coli</i>	12
3.3 การทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ (Purification).....	13
3.4 การวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์.....	15
3.5 การศึกษาความทนทานต่อความร้อน (Thermostability) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ - tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	18
3.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	18
3.7 การตกผลึก (Crystallization) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	20
3.8 การเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์ (Data collection) จากผลึกของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ - tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	21
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย.....	27
ข้อเสนอแนะ.....	28
บรรณานุกรม.....	30
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	34
ภาคผนวก ข.....	37

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค.....	40
ภาคผนวก ง.....	43
ประวัติผู้วิจัย.....	46

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชุด primer ที่ใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency).....	10
3.1 สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) ที่ 15 °ซ สำหรับ non-heated His ₆ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	22
3.2 สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) ที่ 15 °ซ สำหรับ heated His ₆ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	24
1ง ส่วนผสมของสารละลายในการทำ crystallization optimization จากสภาวะ OPT7 (ดัดแปลงมาจากสภาวะเริ่มต้น CryO I/II: G3).....	44
2ง ส่วนผสมของสารละลายในการทำ CRYSTALLIZATION OPTIMIZATION จากสภาวะ OPT9 (ดัดแปลงมาจากสภาวะเริ่มต้น OZMA 1K4K: A7).....	45
3ง ส่วนผสมของสารละลายในการทำ crystallization optimization จากสภาวะ OPT10 (ดัดแปลงมาจากสภาวะเริ่มต้น Ozma 8K10K: G7).....	45

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
3.1 PCR product ที่ได้จากการใช้ primer ชุดต่าง ๆ กันเมื่อใช้ Genomic DNA จาก <i>P. furiosus</i> เป็น template).....	13
3.2 ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ขนาดย่อม (small-scale) ใน <i>E. coli</i> strain Rosetta (DE3) pLysS.....	14
3.3 ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ขนาดย่อม (small-scale) ใน <i>E. coli</i> strain BL21-Codonplus (DE3)-RIL.....	15
3.4 Purification profile ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	16
3.5 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่เป็นผลจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยระบบอัตโนมัติ AKTAXpress system.....	17
3.6 ผลการวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA Polymerase.....	17
3.7 ผลการศึกษาความทนทานต่อความร้อน (Thermostability) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	18
3.8 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase กับ commercial Promega <i>Pfu</i> DNA polymerase.....	19
3.9 ผลการตรวจประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ผ่านการให้ความร้อน 23 ชม.....	19
3.10 ผลึกของ non-heated His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ได้จากการทำ crystallization screening ที่สภาวะต่าง ๆ.....	25
3.11 ตัวอย่าง single crystal ของ non-heated His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ได้จากการ optimization สภาวะ OPT9-F6.....	26
3.12 ตัวอย่าง single crystal ของ heated His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ได้จากการ optimization สภาวะ HTS I: G3.....	26
1ก ลำดับเบสของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ถูกโคลน.....	36
1ข ความเข้มของ DNA band (หน่วย: arbitrary unit) ที่ได้จากการใช้โปรแกรม Quantity One® Software.....	39
1ค ตัวอย่างผลึกของโปรตีนชนิด non-heated His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ได้จากการทำ crystallization screening ต่าง ๆ จากการทำให้บริสุทธิ์.....	41

สารบัญ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2ก ตัวอย่างผลึกของโปรตีนชนิด heated His ₈ -tagged <i>Pfu</i> DNA polymerase ที่ได้จากสภาวะต่าง ๆ	
จากการทำ crystallization screening.....	42

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นที่น่าสนใจกันอย่างแพร่หลาย และสามารถทำได้ โดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมซึ่งนำยีนที่เราสนใจมาตัดต่อเข้ากับเวกเตอร์ แล้วจึง transform เข้าสู่เชื้อจุลินทรีย์ การอาศัยจุลินทรีย์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เราสนใจ นั้น มีข้อได้เปรียบมากกว่าการผลิตโปรตีนโดยการสกัดจากแหล่งธรรมชาติหรือเนื้อเยื่อดั้งเดิม คือ สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากกว่า มีวิธีการในการแยกโปรตีนที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมาก เนื่องจากมีโปรตีนปนเปื้อนที่น้อยกว่า นอกจากนี้ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านมีการเจริญรวดเร็ว และยังสามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการได้โดยควบคุมที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ ซึ่ง ข้อได้เปรียบดังกล่าวนี้ทำให้มีงานวิจัยในห้องปฏิบัติการอย่างหลากหลายโดยมุ่งเน้นการพัฒนาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้มีปริมาณและคุณภาพสูงขึ้น

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่เราสนใจก่อนนำไปตัดต่อเข้ากับเวกเตอร์ เอนไซม์ที่สำคัญใน กระบวนการนี้ คือ DNA polymerase ซึ่งทำหน้าที่คือนิวคลีโอไทด์ให้เป็นสาย โดยมีส่วนยีนที่เรา สนใจเป็นแม่แบบ

ในบางครั้ง DNA polymerase คือนิวคลีโอไทด์ที่ผิดไปจากแม่แบบ ทำให้เกิด mutation ในยีน ที่เราสนใจ ซึ่งจะส่งผลไปถึงรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่จะถูกผลิตขึ้นด้วย เอนไซม์ DNA polymerase ที่ มีความแม่นยำมากที่สุดในการเกิดปฏิกิริยา คือ DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus* หรือ *Pfu polymerase* (Cline, *et al.*, 1996) ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการที่มีการ ทำพันธุวิศวกรรมหรือการทำโคลนนิ่งยีน โดย *Pfu polymerase* ที่ใช้จะต้องสั่งมาจากบริษัท ต่างประเทศซึ่งมีราคาที่สูง เนื่องจากว่าราคาที่สูงนี้ทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่ใช้กันอย่าง จำกัด การที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ใช้ได้เองในห้องปฏิบัติการ หรือแจกจ่ายให้กับมหาวิทยาลัยอื่น ๆ ที่มีการใช้เอนไซม์นี้ นอกจากจะสามารถลดการนำเข้าเอนไซม์ *Pfu polymerase* นี้ได้แล้ว ยังทำให้ ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ สามารถใช้เอนไซม์นี้ได้โดยไม่จำกัด

DNA polymerase แบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ *Escherichia coli* DNA polymerase I (Pol I) family และ Eukaryotic DNA polymerase α family และยังมีแบ่งแยกย่อยลงไปอีก คือ DNA polymerase families A, B, และ C ซึ่งเป็นการแบ่งตามความเหมือน (homology) กับ *E. coli* Pol I, II, และ III DNA polymerase จาก *P. furiosus* (*Pfu* DNA polymerase) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม α family และเป็น family B (Mathur, *et al.*, 1991; Uemori, *et al.*, 1993)

Pfu polymerase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในความสนใจมากกว่า DNA polymerase ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมี 3'-5' exonuclease activity ซึ่งสามารถแก้ไขความผิดพลาดในการต่อสายนิวคลีโอไทด์ในการ amplification ด้วย PCR และยังมีรายงานอัตราความผิดพลาดในการต่อนิวคลีโอไทด์ของ *Pfu* DNA polymerase ว่าน้อยกว่า *Taq* DNA polymerase 7 ถึง 10 เท่า และน้อยกว่า 2 ถึง 30 เท่า เมื่อเทียบกับ DNA polymerase ชนิดอื่น ๆ เช่น *Vent*, *deep Vent*, *Pwo* และ *Ultma* (Lundberg, et al., 1991; Eckert and Kunkel, 1991; Cline, et al., 1996)

Pfu ถูกคิดค้นขึ้นมาครั้งแรกจากโปรตีนสกัดโดยตรงจาก *P. furiosus* แต่เนื่องจากความเป็น Thermophilic และ anerobic ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้จึงทำให้มีความยุ่งยากในการเลี้ยงเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีปริมาณมาก ๆ (Lundberg, et al., 1991) จึงมีการผลิตโดยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้ Baculovirus (Mroczkowski, et al., 1994) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในทางการค้า อย่างไรก็ตาม การใช้ระบบ baculovirus เป็นระบบที่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการคิดค้นวิธีผลิตเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase นี้ โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งสามารถเลี้ยงได้ง่าย รวดเร็ว และยังมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมาก เมื่อเทียบกับการผลิตระบบเดิม (Lu and Erickson, 1997; Dabrowski and Kur, 1998) และด้วยเทคโนโลยีการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (protein purification) โดยใช้เทคนิค affinity chromatography ที่ง่ายและรวดเร็ว ทำให้ระบบการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ด้วย *E. coli* เป็นระบบที่น่าสนใจมากในปัจจุบัน

เนื่องด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ของ *Pfu* DNA polymerase คือ มีคุณสมบัติทนทานต่อความร้อนสูงมาก และยังมี fidelity มากที่สุดในบรรดา DNA polymerase ที่ทนทานต่อความร้อนชนิดอื่น ๆ ที่มีการค้นพบนี้เอง ทำให้การเข้าใจในคุณสมบัติความทนทานต่อความร้อนสูง (Hyperthermostability) และกลไกการควบคุมการทำงานของ proofreading activity ของ *Pfu* DNA polymerase ในเชิงโครงสร้าง (structural) จึงเป็นสิ่งที่สนใจอย่างยิ่ง เพราะนอกจากจะเป็นการเพิ่มเติมความรู้พื้นฐานกระบวนการทางชีวภาพ และข้อมูลเพื่อใช้ในการปรับปรุง DNA polymerase ชนิดอื่น ๆ แล้ว การทำออกแบบ หรือตกแต่งโปรตีน (Protein engineering) ของ *Pfu* DNA polymerase เพื่อปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์ในแง่ต่าง ๆ ก็ย่อมทำได้หลังจากที่ได้โครงสร้างของมันมาแล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่มีกลุ่มวิจัยใดสามารถหาโครงสร้างของ *Pfu* DNA polymerase ได้สำเร็จ จึงไม่มีข้อมูลทางด้านโครงสร้างของมัน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อโคลนยีน DNA polymerase จาก *P. furiosus*
- 2) เพื่อผลิตในแบคทีเรีย *E. coli*, ทำให้บริสุทธิ์ (purification) และตรวจสอบ activity ต่าง ๆ ของเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase

- 3) เพื่อตกผลึกเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase
- 4) เพื่อหาข้อมูลเอ็กซ์เรย์เบื้องต้นของเอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ได้ทำการโคลนยีน *Pfu* Thermostable DNA polymerase จาก Genomic DNA ของ *P. furiosus* เข้าไปสู่ vector pSY5 และเปรียบเทียบการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase โดยแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS และ BL21-Codonplus (DE3)-RIL หลักจากนั้นได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (protein purification) ด้วยระบบทำให้บริสุทธิ์แบบอัตโนมัติ AKTAXpress system แล้ววัดปริมาณ และตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ โดยการตรวจสอบ activity ประกอบด้วย การหา relative DNA polymerase activity, การศึกษาความทนทานต่อความร้อน (thermostability) และการตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) หลักจากนั้น ได้ทำการตกผลึกรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase โดยการทำให้ crystallization screening เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมก่อนการทำ crystallization optimization เพื่อให้ได้ single crystal ที่ได้ถูกนำไปศึกษาการหักเหแสงเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction) ในขั้นตอนการเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผลิตได้ ได้ถูกใช้แล้วในห้องปฏิบัติการทาง Molecular Cloning ของเรานอง ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายค่าใช้จ่ายในการซื้อเอนไซม์นี้ได้อย่างมาก เนื่องจากต้องการใช้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้แล้วยังได้แจกจ่ายให้แก่กลุ่มวิจัยอื่น ๆ เพื่อใช้ในเทคนิค PCR ในกระบวนการโคลนยีนอีกหลายกลุ่ม อาทิเช่น BR Lab และ VN Lab แห่ง IMCB ประเทศสิงคโปร์ ; ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด และห้องปฏิบัติการ ของ ผศ. ดร. มณฑารพ ยมาภย์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ ห้องปฏิบัติการ ของ Dr. Albert's Lab สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นต้น นอกจากนี้ ข้อมูลเอ็กซ์เรย์เบื้องต้นที่ได้จะถูกใช้ในการหาโครงสร้างของ *Pfu* DNA polymerase ต่อไป ซึ่งที่ผ่านมายังไม่มีการหาโครงสร้างของ *Pfu* DNA polymerase โดยเมื่อการหาโครงสร้างดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์นอกจากจะเป็นการเพิ่มเติมความรู้พื้นฐานกระบวนการทางชีวภาพและข้อมูลเพื่อใช้ในการปรับปรุง DNA polymerase ชนิดอื่น ๆ แล้ว การทำออกแบบหรือตกแต่งโปรตีน (Protein engineering) ของ *Pfu* DNA polymerase เพื่อปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์ในแง่ต่าง ๆ ก็ย่อมทำได้ หลังจากที่ได้โครงสร้างของมันมาแล้ว

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

- *E. coli* สายพันธุ์ NovaBlue (Novagen) ใช้ในกระบวนการโคลนยีน และการเตรียมพลาสมิด

- *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) and BL21-Codonplus (DE3)-RIL (Stratagene) ใช้ในการแสดงออก (express) หรือผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์

2.1.2 พลาสมิดเวกเตอร์

พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ pSY5 plasmid (ซึ่งดัดแปลงมาจาก pET21d) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ได้ถูกออกแบบให้มีโคดอนของกรดอะมิโน Histidine 8 ตัว อยู่ทางด้านหน้า Multi Cloning Site (MCS) [Plasmid vector นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Bob Robinson Laboratory (BR Lab) แห่ง Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB), ประเทศสิงคโปร์]

2.1.3 เอนไซม์

- *Pfu* DNA polymerase (Promega)
- *Sfi*I และ *Kpn*I restriction enzyme (Fermentas)
- T4-DNA ligase (Promega)
- Chicken egg white lysozyme (Merck)

2.1.4 ชุดอุปกรณ์และสารเคมีอื่น ๆ

- genomic DNA of *P. furiosus* (DSM 3638) (ATCC)
- PCR purification kit (QIAGEN)
- Plasmid preparation kit (QIAGEN)
- BigDye Terminator kit (Applied Biosystems)
- λ DNA (Fermentas)

2.2 เครื่องมือ

- ระบบทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แบบอัตโนมัติ AKTAXpress system (GE Healthcare) ซึ่งประกอบด้วย affinity, desalting, ion exchange และ gel filtration chromatography
- เครื่อง PCR GeneAmp 9700 96 well (0.2ml) Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- เครื่องมือถ่ายภาพเจล Gene-Flash Gel Doc (Syngene Bioimage)

- เครื่องมือวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอ ABI Prism 373 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง Refrigerated High Speed Centrifuge, Model RC 26 PLUS (Sorvall, Dupont)
- เครื่องมือวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอและโปรตีน NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Biofrontier)
- เครื่องมือแบบอัตโนมัติในการทำ Crystallization screening Screenmaker 96+8 crystallization robot (Innovadyne)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การโคลนยีน DNA polymerase จาก *P. furiosus*

Primers ที่ครอบคลุมส่วนของปลาย 5' (amino-terminus) และ ปลาย 3' (carboxyl-terminus) เพื่อใช้ในการปฏิกิริยา PCR เพื่อ amplify ยีน DNA polymerase แบบเต็มสาย (ขนาด 2.37 kb) จาก Genomic DNA ของ *P. furiosus* ได้ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับเบสของยีน *Pfu* DNA polymerase ที่ได้มาจากฐานข้อมูล NCBI (Accession No. D12983) โดย primer ได้ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 เป็น primer ที่ไม่มี restriction sites ซึ่งประกอบด้วย PfuFL-for 5'-ATG ATT TTA GAT GTG GAT TAC ATA ACT G-3' และ PfuFL-rev 5'- TAG GAT TTT TTA ATG TTA AGC CAG GAA GTT AGG-3' ส่วน primer ชุดที่ 2 เป็น primer ที่มี restriction sites ซึ่งประกอบด้วย PfuFL-for-*Sfi*I 5'-GGG CCC GGG CCG ATG ATT TTA GAT GTG GAT TAC ATA ACT G-3' and PfuFL-rev-*Kpn*I 5'-GGG GTA CCC CCT AGG ATT TTT TAA TGT TAA GCC AGG AAG TTA GG-3'

ปฏิกิริยา PCR ในปริมาณ 50 μ l ประกอบด้วย *P. furiosus* genomic DNA (200 ng), primer แต่ละตัว (ที่มีความเข้มข้น 10 μ M) ปริมาณ 1 μ l, dNTPs (10 mM) 1 μ l, 10X PCR buffer (ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl, pH 8.8 ณ 25 °C, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% Triton X-100) 5 μ l, และ 3 U ของ thermostable *Pfu* DNA polymerase (Promega) โดยในรอบแรกใช้ primer ชุดที่ 1 ในการทำ PCR หลังจากนั้นได้มีการทำ nested PCR โดยมีองค์ประกอบในการทำ PCR อื่น ๆ เหมือนดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น ยกเว้น template และ primer กล่าวคือ นำผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจาก primer ชุดที่ 1 ในปริมาณ 1 μ l มาเป็น template ในการทำ PCR โดยใช้ primer ชุดที่ 2 การให้รอบความร้อน (thermal cycle) ของปฏิกิริยา PCR ได้ทำโดยเครื่อง thermal cycler อัตโนมัติ หรือเครื่อง PCR GeneAmp 9700 โดยการให้ความร้อนเริ่มต้นที่ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยการวนรอบเป็นจำนวน 30 รอบของการให้ความ

ร้อนดังต่อไปนี้ คือ denaturation ที่ 95 °ซ นาน 1 นาที, annealing ที่ 65 °ซ นาน 30 วินาที และ elongation ที่ 73 °ซ นาน 2 นาที 30 วินาที จากนั้น จบกระบวนการให้ความร้อนด้วยการ extension ช่วงสุดท้ายที่ 73 °ซ นาน 7 นาที ต่อจากนั้น การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ได้ทำโดย 1 % agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

PCR product ได้ถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์โดย PCR purification kit (QIAGEN) จากนั้น PCR product ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และพลาสมิดเวกเตอร์ได้ถูกตัดอย่างจำเพาะ (digest) ด้วย *Sfi*I และ *Kpn*I restriction enzyme (Fermentas) จากนั้นทั้ง PCR product และพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดอย่างจำเพาะแล้ว ก็ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย PCR purification kit ก่อนการถูกนำมาต่อกันด้วย เอนไซม์ T4-DNA ligase (Promega) แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* NovaBlue (Novagen) เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิดและ พลาสมิดได้ถูกเตรียมโดย Plasmid preparation kit (QIAGEN) โดยกระบวนการต่าง ๆ ข้างต้นได้ดำเนินการตามวิธีการในคู่มือของบริษัทผู้ขาย พลาสมิดที่ได้ถูกตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยกระบวนการ DNA sequencing โดยการใช้ BigDye Terminator kit และ เครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ABI Prism 373 Genetic Analyzer

2.3.2 การผลิต (Expression) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ใน *E. coli*

พลาสมิดที่ถูกตรวจสอบความถูกต้องแล้วได้ถูก transform เข้าสู่ *E. coli* 2 สายพันธุ์ คือ Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) และ BL21-Codonplus (DE3)-RIL (Stratagene) เพื่อหาสภาวะ แล สายพันธุ์ ของแบคทีเรียที่ดีกว่า ในการผลิต (expression) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ก่อนการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น (scale-up) ในเบื้องต้นได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ขนาดเล็ก (small-scale) ในแบคทีเรียทั้งสอง โดยมีวิธีการดังนี้ คือ เชื้อ *E. coli* ดังกล่าวถูกเลี้ยงในหลอดทดลองที่ 37 °ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 10 ml ที่มี Ampicillin 100 µg/ml และ chloramphenicol 34 µg/ml จนกระทั่งเชื้อเจริญจนได้ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 600 nm (A₆₀₀) เท่ากับ 0.6 จากนั้นเติม IPTG ลงไปในหลอดเลี้ยงเชื้อนั้นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อเหนี่ยวนำ (induction) ให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter โดยสภาวะในการเหนี่ยวนำได้ถูกเปรียบเทียบกันระหว่าง การเหนี่ยวนำที่ 37 °ซ นาน 5 ชม กับ 25 °ซ นาน 18 ชม

การผลิตในขนาดใหญ่ขึ้น คือ 2 ลิตร ใน shake-flask เพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ปริมาณมากขึ้น เพื่อใช้ต่อไปในการทดลอง ได้ใช้เฉพาะ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) และสภาวะการเหนี่ยวนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ที่ 25 °ซ เป็นเวลา 18 ชม

2.3.3 การทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ (Purification)

เซลล์แบคทีเรียได้ถูกแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที โดยทิ้งส่วน supernatant ไปแล้วเก็บเฉพาะส่วน pellet จากนั้น resuspend ส่วน pellet ด้วย 100 ml ของ Ni²⁺-Binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 20 mM Imidazole) เพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ถูกผลิตในเซลล์แบคทีเรียที่เรียกว่า เซลล์แบคทีเรียจะต้องถูกทำให้แตกสลายก่อน โดยเซลล์ถูกทำให้แตกสลายด้วยการย่อยด้วย lysozyme ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml ที่ 4 °C เป็นเวลา 1 ชม ก่อนการ sonication จากนั้น เศษซากเซลล์ (cell debris) ได้ถูกกำจัดออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 18,000 rpm เป็นเวลา 45 นาที โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ละลายได้ (soluble enzyme) จะปะปนกับโปรตีนที่ไม่ต้องการอื่น ๆ (impurity) อยู่ในส่วน supernatant หลังจากนั้นส่วน supernatant นี้ ได้ถูก load เข้าสู่ระบบการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แบบอัตโนมัติ AKTAXpress Purification System (GE Healthcare) ซึ่งประกอบด้วย affinity (Ni²⁺ HisTrap_FF_1ml_Xpress column), desalting (HiPrep_26/10_desalting column), anion exchange (Resource_Q_1ml column) and gel filtration (HiLoad_16/60_Superdex200_prep grade column) chromatography เพื่อทำ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ โดยขั้นตอนแรกของ affinity chromatography คือ “Binding” ซึ่ง supernatant ที่อยู่ใน Ni²⁺-Binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 20 mM Imidazole) นั้น จะถูกไหลลงเข้าสู่ Ni²⁺ column จากนั้นคือการ “Washing” ซึ่งเป็นการล้างหรือกำจัด impurity ที่ไม่ได้จับกับ Ni²⁺ ที่อาจยังคงค้างอยู่ใน column ด้วย 40 ml ของ Ni²⁺-Binding buffer และในขั้นตอนสุดท้ายของ affinity chromatography คือ “Elution” ด้วย 5 ml ของ Ni²⁺-Elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 500 mM NaCl, and 500 mM Imidazole) ซึ่งเป็นการชะ (elute) เอนไซม์ที่เราสนใจออกมาจาก Ni²⁺ column หลังจากนั้นเอนไซม์จะถูกนำพาเข้าสู่ Desalting column ด้วย Anion Exchange Binding buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.8) เพื่อกำจัด NaCl ออกจากสารละลายโปรตีนนั้น ก่อนเข้าสู่ anion exchange column แล้วโปรตีนจะถูก elute ออกจาก column ด้วย Anion Exchange Elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1 M NaCl) จนกระทั่งประมาณ 60% gradient หรือจนกระทั่งพบว่าไม่มีโปรตีนออกมาจาก column อีกแล้ว ต่อจากนั้น สารละลายโปรตีนที่ถูก elute ออกมา จะเข้าสู่ Gel filtration column โดยการนำพาของ Gel Filtration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5 and 150 mM NaCl) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยเครื่องมืออัตโนมัตินี้จะเก็บโปรตีน fraction ละ 2 ml

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ทำโดย SDS-PAGE โดยนำโปรตีนในแต่ละ fraction มา fraction ละ 5 µl ผสมกับ 5 µl ของ 5X loading buffer (225 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50%

glycerol, 5% SDS, 0.05% bromophenol blue, 250 mM DTT) แล้ว run ด้วย 15% SDS-polyacrylamide gel ที่ 190 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นทำการย้อม (stain) gel ด้วย staining buffer (0.025% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% (v/v) methanol, and 7% (v/v) acetate acid) เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการ destain ด้วย destaining buffer (40% (v/v) methanol and 7% (v/v) acetate acid) เป็นเวลา overnight จากนั้น gel ที่ได้ถูกนำไปถ่ายภาพด้วย Gene-Flash Gel Doc (Syngene Bioimage)

การวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่บริสุทธิ์แล้วนั้น ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 nm (A_{280}) ด้วย NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Biofrontier) โดยใช้ค่า extinction coefficient $A_{280} = 0.74$ สำหรับโปรตีนเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่บริสุทธิ์แล้วนี้ ถูก concentrate ให้มีความเข้มข้น 15 และ 20 mg/ml โดย concentrating column สำหรับโปรตีน Vivaspin (Vivascience)

2.3.4 การวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์

รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 20 mg/ml ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.4 µg/µl ด้วย *Pfu* storage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% NP-40, 0.1% Tween 20, 50% (w/v) glycerol) การวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์ ทำโดยการวัดความเข้มของ PCR product band (band intensity) ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผลิตในงานวิจัยนี้ เทียบกับการใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase จากบริษัท Promega โดยในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการเปรียบเทียบนั้น ได้ใช้พลาสมิด pVLN1 ซึ่งมีส่วนของยีน Plant Villin1 (VLN1) เป็น template โดย primer ที่ใช้คือ For_VLN1 5'-GGG CCC GGG CGG CCG ATG TCT AGG CTA AGT AAA GAC ATT GAT TC-3' และ Rev_VLN1 5'-GGG GTA CCC CTT ATC CTT TTT GTT TGA ACA ACG CAG CCA C-3' ที่ amplify PCR product (amplicon) ในส่วนที่เป็นส่วนย่อยของยีน VLN1 ที่มีขนาด 1,150 bp ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 µl นั้น ประกอบด้วย พลาสมิดที่เป็น template (10 pg) 1 µl, 5 µl ของ 10X reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25 °C, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% Triton X-100), 1 µl (10 µM) ของ primer แต่ละตัว และ 1 µl (10 mM) ของ dNTPs. โดยในแต่ละการทดลองได้ใช้รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ในปริมาณที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้คือ 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 µg และเปรียบเทียบกับการใช้ 3 U ของ *Pfu* DNA polymerase จาก Promega โดยมี thermal cycle ดังนี้ คือ 95 °ซ นาน 2 นาที; 30 รอบ ของ 95 °ซ 1 นาที, 65 °ซ 30 วินาที และ 73 °ซ 2 นาที 30 วินาที; และตามด้วย 73 °ซ เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้นแล้ว PCR

product ในปริมาณ 5 μ l ในแต่ละการทดลองได้ถูกนำมา run ด้วย 1% agarose gel โดยความเข้มของ DNA band ได้ถูกวัดและเปรียบเทียบโดยโปรแกรม Quantity One® Software (Bio-Rad)

2.3.5 การศึกษาความทนทานต่อความร้อน (Thermostability) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

สำหรับการศึกษาความทนทานต่อความร้อน (thermostability) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase นั้น เอนไซม์ได้ถูกให้ความร้อนที่ 97.5 °ซ เป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 23 ชม ก่อนการนำไปตรวจสอบ activity ในปฏิกิริยา PCR โดยเอนไซม์ที่ถูกให้ความร้อนแล้วได้ถูกเก็บที่ 4 °ซ overnight ก่อนการนำไปตรวจสอบ activity ยกเว้นเอนไซม์ที่ 23 ชม ซึ่งถูกนำไปตรวจสอบ activity โดยทันทีหลังการให้ความร้อน

การตรวจสอบ activity นั้น ได้กระทำเช่นเดียวกับการตรวจสอบ activity ในข้อ 2.3.4 โดยใช้เอนไซม์ที่ถูกให้ความร้อนเป็นเวลาแตกต่างกันในปริมาณ 5 U

2.3.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

วิธีนี้ได้ถูกอธิบายไว้แล้วโดย Wang, *et al.* (1997) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อใช้งานวิจัยนี้ มีวิธีการทำโดยใช้ λ DNA (Fermentas) ปริมาณ 150 ng เป็น template ในปฏิกิริยา PCR โดยได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน, รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผ่านการให้ความร้อน 23 ชม และ *Pfu* DNA polymerase จาก Promega ในการ amplify PCR product ที่มีขนาดต่าง ๆ กัน (amplicon) โดยตารางที่ 2.1 แสดงชุด primer และลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการ amplify ให้ได้ amplicon ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ 0.5, 1, 2, 5, 8, 10, 12 และ 15 kb

ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 μ l ประกอบด้วย 1 μ l ของ λ DNA (150 ng), 5 μ l ของ 10X reaction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25 °C, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% Triton X-100), 1 μ l (10 μ M) ของ primer แต่ละตัว, 1 μ l (10 mM) ของ dNTPs และ 5 U ของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ตั้งไว้แล้วข้างต้น โดยมี thermal cycle ดังต่อไปนี้ คือ 95 °ซ นาน 20 วินาที; 20 รอบ ของ 94 °ซ 5 วินาที และ 73 °ซ 2 นาที 30 วินาที; และตามด้วย 73 °ซ เป็นเวลา 7 นาที เมื่อปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้นแล้ว PCR product ในปริมาณ 5 μ l ในแต่ละการทดลองได้ถูกนำมา run เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ด้วย 1% agarose gel

ตารางที่ 2.1 ชุด primer ที่ใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency)

ชื่อ primer	ลำดับเบสของ primer
PfuExL30350F	5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'
PfuExL-0.5R (0.5 kb)	5'-TCCGGATAAAAACGTCGATGACATTTGC-3'
PfuExL-1R (1 kb)	5'-GATGACGCATCCTCACGATAATATCCGG-3'
PfuExL-2R (2 kb)	5'-CCATGATT CAGTGTGCCCGTCTGG-3'
PfuExL-5R (5 kb)	5'-CGAACGTCGCGCAGAGAAACAGG-3'
PfuExL-8R (8 kb)	5'-GCCTCGTTGCGTTTGTTCACAG-3'
PfuExL-10R (10 kb)	5'-GCACAGAAGCTATTATGCGTCCCCAGG-3'
PfuExL-12R (12 kb)	5'-TCTTCCTCGTGCATCGAGCTATTCGG-3'
PfuExL-15R (15 kb)	5'-CTTGTTCCITTTGCCGCGAGAATGG-3'

2.3.7 การตกผลึก (Crystallization) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

ในการตกผลึกนั้น รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 15 และ 20 mg/ml ได้ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามการเตรียมโปรตีนก่อนการนำไปตกผลึก คือ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ถูกนำไปทำการตกผลึกทันที หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์และ concentrate แล้ว และอีกชนิดหนึ่ง คือ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และ concentrate แล้ว ถูกให้ความร้อนที่ 97.5 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทำการตกผลึก

ในกระบวนการตกผลึกเบื้องต้นนั้น ตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ได้นำไปตกผลึกในสภาวะต่าง ๆ อย่างกระจัดกระจายที่อุณหภูมิ 15 °ซ (crystallization screening) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการตกผลึกของโปรตีนแต่ละชนิด โดยใช้ชุด crystallization screening kit ที่มีจำหน่ายเป็นการค้า (commercial) โดย non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ได้ถูก screen โดยใช้ชุด kit The Pegs (QIAGEN), Ozma PEG1K&4K, Ozma PEG8K&10K, and CryO I/II (Emerald Biosystems), whereas JBScreen HTS I, HTS II (JENA Bioscience); Index และ High Throughput (HAMPTON

Research) ส่วน heated His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase นั้น ได้ screen โดยใช้ The Pegs (QIAGEN); Ozma PEG1K&4K, Ozma PEG8K&10K, WIZARD I/II, and CryO I/II (Emerald Biosystems) โดยการตกผลึกดังกล่าวได้ใช้เทคนิค Sitting drop, vapor diffusion และทำโดยใช้เครื่องมือ ScreenMaker 96+8 crystallization screening robot (Innovadyne)

การทำ optimization ของ non-heated His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ทำโดยใช้สภาวะต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ง

2.3.8 การเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์ (Data collection) จากผลึกของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase

การเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์จากผลึกของ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ได้ดำเนินการที่ beamline BL13B1 ณ National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC), Hsinchu, Taiwan โดยผลึกของโปรตีนแต่ละอันถูกตัด (mounting) ขึ้นมาจาก mother liquid ด้วย cryoloop (Hampton) แล้วย้ายไปแช่ใน cryosolution (mother liquor ที่มี 20% glycerol) ทันที เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที ก่อนการแช่เย็นอย่างรวดเร็ว (flash-cooled) ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปติดตั้งบน beamline ที่มีกระแสไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ 100 K ไหลผ่านตลอดเวลาเพื่อให้ความเย็นแก่ผลึกตลอดเวลาในขณะที่ทำการเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์ โปรแกรมที่ใช้ในการควบคุมการเก็บข้อมูลคือ โปรแกรม Blu-Ice 4 โดยมี ADSC Quantum-315 CCD detector เป็นอุปกรณ์ตรวจเก็บข้อมูลการ diffraction ของเอ็กซ์เรย์โดยผลึก ข้อมูลที่ maximum resolution เป็น 3.0 Å ถูกเก็บที่ระยะห่างระหว่าง crystal กับ detector เท่ากับ 450 mm โดยมีการหมุนผลึกทุก 1° (1° oscillation) ในทุก ๆ 60 วินาที จนกระทั่งได้องศาครบทั้งสิ้น 180°

บทที่ 3

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.1 การโคลนยีน DNA polymerase จาก *P. furiosus*

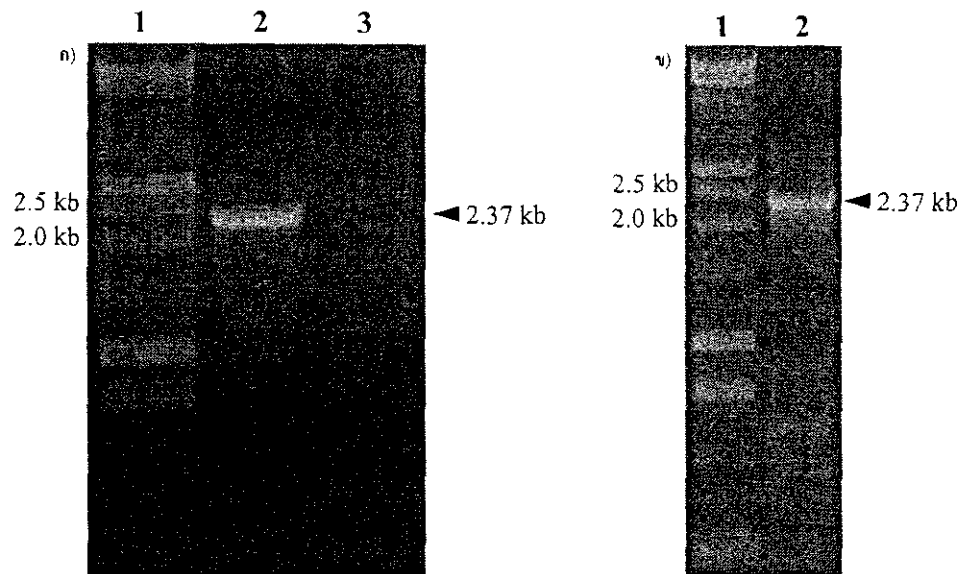
จากการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อ amplify ยีน DNA polymerase จาก genomic DNA ของ *P. furiosus* โดยใช้ primer ทั้ง 2 เซตนั้น คือ เซตที่ 1 เป็น primer ที่ไม่มี restriction sites และ เซตที่ 2 เป็น primer ที่มี restriction sites พบว่า ได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 2.37 kb เพียงจากการใช้ primer เซตที่ 2 เท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่ primer เซตที่ 2 มีเบสจำนวนมากเพิ่มมาในส่วนที่เป็น restriction site จึงทำให้ primer จับกับ template ได้ไม่ค่อยดีหรือไม่ค่อยจำเพาะ (รูปที่ 3.1ก) แต่เมื่อได้ทำ nested PCR กล่าวคือ ได้มีนำผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจาก primer เซตที่ 1 มาเป็น template ในการทำ PCR ใหม่โดยใช้ primer เซตที่ 2 ทำให้ได้ PCR product ที่มี restriction site บริเวณปลายทั้งสองข้างตามที่ต้องการ เพื่อประโยชน์ในการโคลนยีนนี้ เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ (รูปที่ 3.1ข)

จากนั้น PCR product ดังกล่าวถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pSY5 ที่มีการออกแบบให้มี His8-tag ที่ปลาย N-terminus ของยีน *Pfu* DNA polymerase ที่ถูกโคลนนี้ ได้เป็นที่เรียบร้อย ผลการทำ DNA sequencing เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลน พบว่า ยีน *Pfu* DNA polymerase ที่ถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pSY5 นั้น มีลำดับเบสเหมือนกับยีนต้นแบบที่ได้มาจากฐานข้อมูลทุกลำดับเบส (GenBank Accession No. D12983)

3.2 การผลิต (Expression) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ใน *E. coli*

ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ขนาดย่อม (small-scale expression) ใน *E. coli* 2 สายพันธุ์ คือ Rosetta (DE3) pLysS (รูปที่ 3.2) และ BL21-Codonplus (DE3)-RIL (รูปที่ 3.3) พบว่า การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ใน Rosetta (DE3) pLysS ดังรูปที่ 3.2 แสดงให้เห็นว่า การเหนี่ยวนำที่ 25 °ซ, 18 ชม (รูปที่ 3.2: lane 8) มีการผลิตสูงกว่าการเหนี่ยวนำที่ 37 °ซ, 5 ชม (รูปที่ 3.2: lane 10) นอกจากนี้ ยังพบอีกว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ดังกล่าวไม่ถูกผลิตเลยในตัวอย่างที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ (รูปที่ 3.2: lanes 7 และ 9) ซึ่งชี้ให้เห็นถึง ความสามารถในการควบคุม T7 promoter ที่ดีกว่าของ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS แต่ในทางตรงกันข้าม จากการผลการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โดย BL21-Codonplus (DE3)-RIL ดังรูปที่ 3.3 จะเห็นได้ว่า มีการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ในตัวอย่างที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย (รูปที่ 3.4: lanes 7 และ 9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *E. coli* สายพันธุ์ BL21-Codonplus (DE3)-RIL ไม่สามารถควบคุม T7 promoter ได้ดีเท่ากับ Rosetta (DE3) pLysS อย่างไรก็ตาม เช่นเดียวกับการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ใน Rosetta (DE3) pLysS, BL21-Codonplus (DE3)-RIL ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อมีการเหนี่ยวนำที่ 25 °ซ เป็นเวลา 18 ชม (รูปที่ 3.4: lanes 8 และ 10)

เนื่องจากการผลิตที่สูงกว่า (เปรียบเทียบ lane 8 ใน รูปที่ 3.2 และ 3.3) และการควบคุม T7 promoter ที่ดีกว่า (เปรียบเทียบ lane 7 ใน รูปที่ 3.2 และ 3.3) *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS และการเหนี่ยวนำที่ 25 °ซ เป็นเวลา 18 ชม ถูกเลือกใช้ในการผลิตในขนาดใหญ่ขึ้น (scale-up) เพื่อให้ได้เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His8-tagged *Pfu* DNA polymerase ปริมาณมาก เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆ



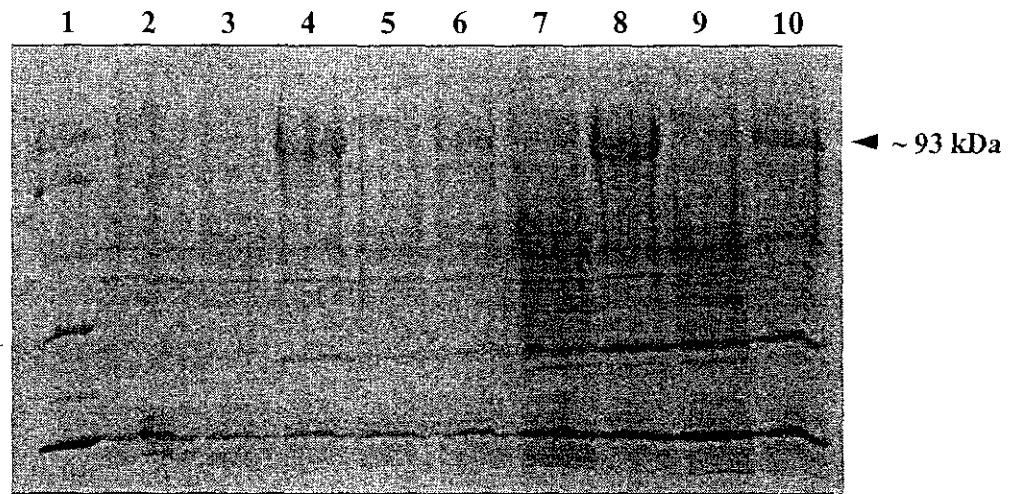
รูปที่ 3.1 PCR product ที่ได้จากการใช้ primer ชุดต่าง ๆ กันเมื่อใช้ Genomic DNA จาก *P. furiosus* เป็น template โดยในรูป (ก) Lane 1: 1 kb Marker; Lane 2: Primer ชุด1; Lane 3: Primer ชุด2 และรูป(ข) คือ Nested PCR จากการใช้ PCR product จาก lane 2 จากรูป (ก) เป็น template โดยใช้ primer ชุด2

3.3 การทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ (Purification)

จากการทำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ให้บริสุทธิ์ด้วยระบบอัตโนมัติ AKTAXpress Purification System โดยมี Ni²⁺ column เป็นขั้นตอนแรกในการทำให้บริสุทธิ์ และจากผลการทดลอง พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์นี้ สามารถจับกับ Ni²⁺ column ได้ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase นี้มี His₈-tag ปรากฏที่ปลาย N-terminus ที่ได้มาจากพลาสมิด จากนั้นเอนไซม์ได้ผ่าน desalting, anion exchange and gel filtration column โดย purification profile ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.4

เมื่อพิจารณารูปที่ 3.4 จะเห็นว่า หลังจาก gel filtration column เอนไซม์ได้ถูกแยกออกเป็นสอง peak คือ peak ที่เล็กมากที่อยู่ด้านหน้า ซึ่งน่าจะเป็นเอนไซม์ส่วนที่ aggregate และ peak หลังที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเป็น peak ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ไม่มีการ

aggregate โดย fraction ของเอนไซม์ในส่วนนี้เท่านั้นที่ถูกนำมารวมกันและใช้ในการทดลองอื่น ๆ ในภายหลัง ในรูปที่ 3.5 ได้แสดงการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย SDS-polyacrylamide gel และความเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ในระดับที่น่าพึงพอใจ หลังจากการวัดปริมาณ โปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีโปรตีน yield เท่ากับ 38 mg/L



รูปที่ 3.2 ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ขนาดย่อม (small-scale) ใน *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE Lane 1: Low-range protein molecular weight marker; Lane 2: Control*; Lane 3: pellet จากเซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ (uninduced cell pellet)** at 25 °C; Lane 4: pellet จากเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำ (induced cell pellet)*** ที่ 25 °C; Lane 5: pellet จากเซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ (uninduced cell pellet)** ที่ 37 °C; Lane 6: pellet จากเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำ (induced cell pellet)*** ที่ 37 °C; Lane 7: ส่วนที่ละลายได้จากเซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ (uninduced soluble)⁺ ที่ 25 °C; Lane 8: ส่วนที่ละลายได้จากเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำ (induced soluble)** ที่ 25 °C; Lane 9: ส่วนที่ละลายได้จากเซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ (uninduced soluble)⁺ ที่ 37 °C; Lane 10: ส่วนที่ละลายได้จากเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำ (induced soluble)** ที่ 37 °C.

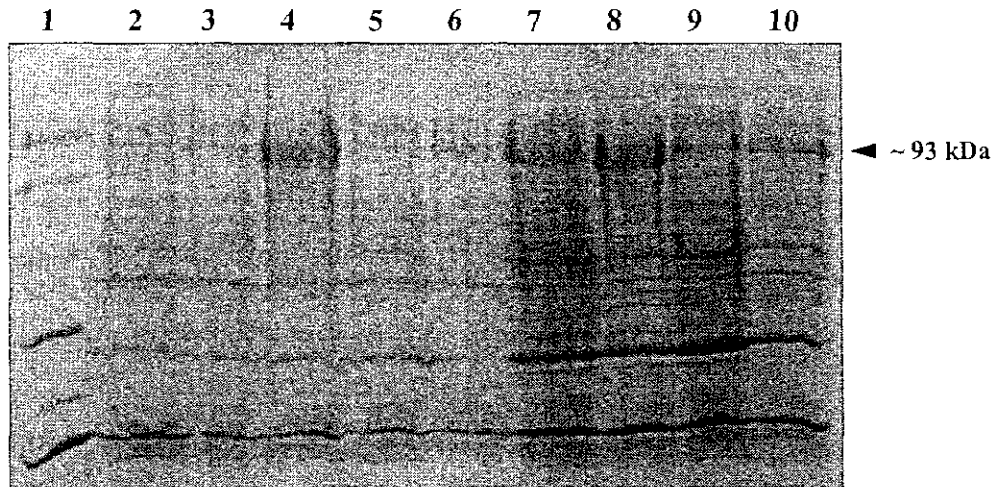
* เซลล์ทั้งหมดที่ถูกเก็บเมื่อเจริญจนกระทั่งมี $A_{600} = 0.6$ โดยไม่มีการเลี้ยงต่อไป

** เซลล์ทั้งหมดที่มีการเลี้ยงต่อไปหลังจากเจริญจนกระทั่งมี $A_{600} = 0.6$ แต่ไม่มีการเหนี่ยวนำ

*** เซลล์ทั้งหมดที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG หลังจากเจริญจนกระทั่งมี $A_{600} = 0.6$

⁺ Supernatant จากเซลล์ที่มีการเลี้ยงต่อไปหลังจากเจริญจนกระทั่งมี $A_{600} = 0.6$ แต่ไม่มีการเหนี่ยวนำ

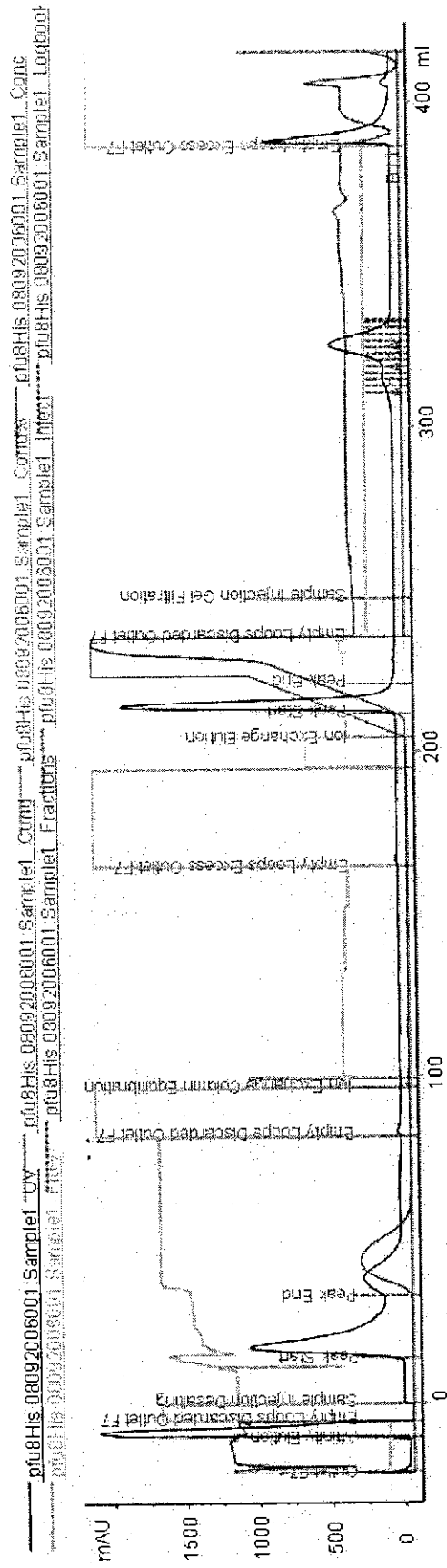
** Supernatants ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG หลังจากเจริญจนกระทั่งมี $A_{600} = 0.6$



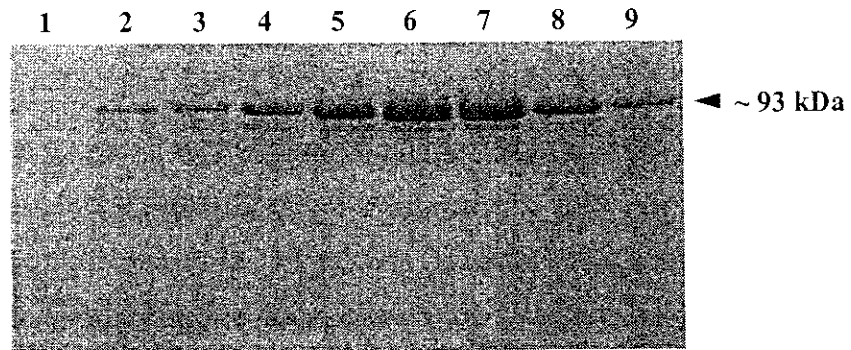
รูปที่ 3.3 ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ขนาดย่อม (small-scale) ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21-Codonplus (DE3)-RIL จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยคำอธิบายเหมือนกันกับรูปที่ 3.2

3.4 การวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์

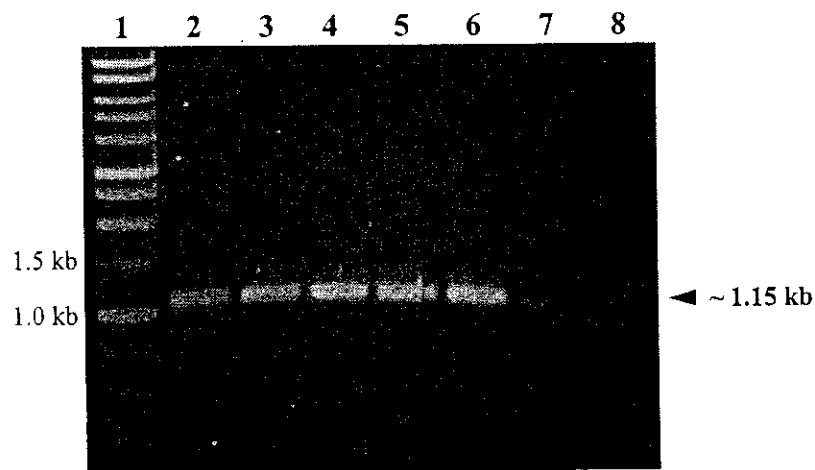
จากรูปที่ 3.6 และ รูปที่ 1ข (ในภาคผนวก ข) ซึ่งเป็นผลจากการวัด relative DNA polymerase activity โดยการเทียบความเข้มของ PCR product band (band intensity) ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผลิตในงานวิจัยนี้ เทียบกับการใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase จากบริษัท Promega ในปฏิกิริยา PCR ที่มีการใช้พลาสมิด pVLN1 เป็น template พบว่า เมื่อใช้ 0.2 μ g ของ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase (lane 2) ทำให้ได้ค่าความเข้มของ band เป็น 2 เท่าของ band ที่ได้จากการใช้ 3 U ของ Promega *Pfu* DNA polymerase (lane 7) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ 0.2 μ g ของ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase มี relative DNA polymerase เป็น 6 U หรือ 30,000 U/mg protein (ดูการคำนวณในภาคผนวก ข) ซึ่งค่า polymerase activity ที่ได้นี้มีค่าที่สามารถเทียบเคียงกับค่าที่ได้จากงานวิจัยอื่น ๆ ที่เคยทำมาแล้ว กล่าวคือ polymerase activity ของ *Pfu* DNA polymerase ที่สกัดโดยตรงจาก *P. furiosus* เท่ากับ 31,713 U/mg protein (Lundberg, *et al.*, 1991), จากการผลิตด้วย baculovirus expression system เท่ากับ 26,000 U/mg protein (Mroczkowski, *et al.*, 1994), จากการใส่พลาสมิดเวกเตอร์ pET11 และผลิตแบบ native protein ใน *E. coli* เท่ากับ 22,500 U/mg protein (Lu and Erickson, 1997) และ จากการใส่พลาสมิดเวกเตอร์ pET30 และผลิตแบบมี N-terminal His₆-tag ใน *E. coli* เท่ากับ 31,000 U/mg protein (Dabrowski and Kur, 1998).



รูปที่ 3.4 Purification profile ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged Pfu DNA polymerase ขั้นตอนแรกในการ purification คือ Ni²⁺ column (หรือ affinity) และตามด้วย desalting, anionic exchange และ gel filtration column



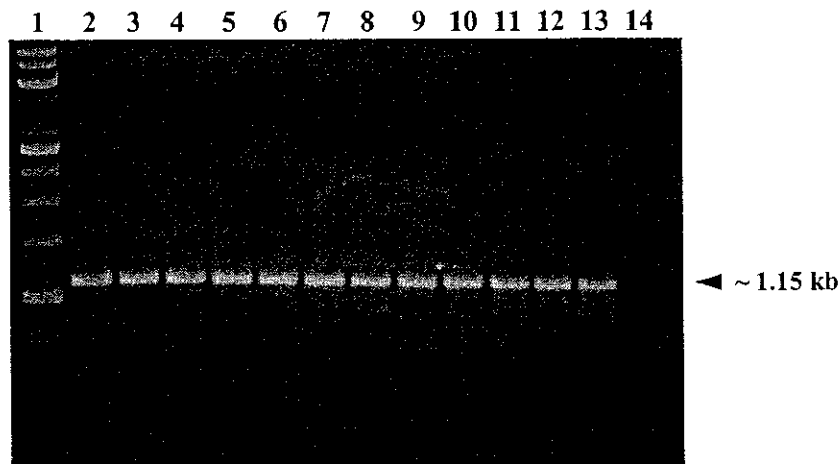
รูปที่ 3.5 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่เป็นผลจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยระบบอัตโนมัติ AKTAXpress system จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE Lane 1: Board-range protein molecular weight marker; Lanes 2-9: protein fraction ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จาก peak หลังที่มีขนาดใหญ่กว่า



รูปที่ 3.6 ผลการวัด relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase หลังจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยระบบอัตโนมัติ Lane 1: 1 kb marker; Lanes 2-6: ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 μ g ตามลำดับ; Lane 7: 3 U ของ Promega *Pfu* DNA polymerase; Lane 8: Control ซึ่งไม่มีการใส่เอนไซม์ใด ๆ ลงไปในปฏิกิริยา PCR

3.5 การศึกษาความทนทานต่อความร้อน (Thermostability) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

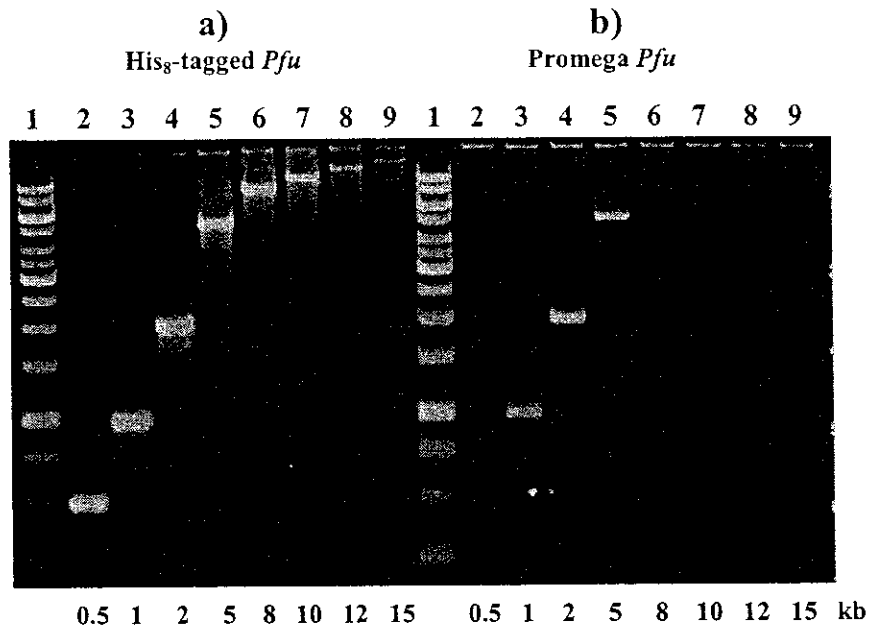
ผลการศึกษาความทนทานต่อความร้อน (thermostability) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase นั้น เอนไซม์ได้ถูกให้ความร้อนที่ 97.5 °ซ เป็นเวลานาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 23 ชม ก่อนการนำไปตรวจสอบ activity ในปฏิกิริยา PCR ได้แสดงในรูปที่ 3.7 โดยจากผลการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ยังคงทนทานและสามารถทำงานได้แม้หลังจากการให้ความร้อนสูงเป็นเวลานานมากถึง 23 ชม ซึ่งเป็นเวลาที่มากที่สุดที่ใช้ในการทดสอบการทนความร้อนในงานวิจัยนี้



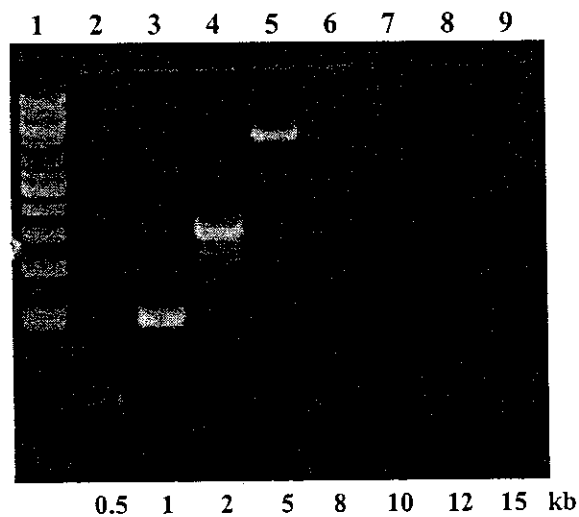
รูปที่ 3.7 ผลการศึกษาความทนทานต่อความร้อน (Thermostability) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase โดยเอนไซม์ถูกให้ความร้อนที่ 97.5 °ซ เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 23 ชม (lane 2-13 ตามลำดับ) ก่อนนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR Lane 1: 1 kb marker; Lane 14: control (ไม่มีการใส่เอนไซม์ใด ๆ ลงไปในปฏิกิริยา PCR)

3.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

ผลการทดลองในรูปที่ 3.8 แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้เวลาในการ extension เท่ากัน รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ก็สามารถ amplify PCR product ได้ยาวจนถึง 15 kb ในขณะที่ Promega *Pfu* DNA polymerase สามารถ amplify ได้ยาวถึง 8 kb เท่านั้น ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผลิตโดยงานวิจัยนี้ มีประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) สูงกว่า commercial Promega *Pfu* DNA polymerase (เป็น native form ที่



รูปที่ 3.8 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase (ก) กับ commercial Promega *Pfu* DNA polymerase (ข) Lane 1: 1 kb marker; Lanes 2-9: amplicon ที่มีขนาด 0.5, 1, 2, 5, 8, 10, 12 และ 15 kb ตามลำดับ (ตัวเลขด้านล่างของรูปภาพแสดงขนาดของแต่ละ amplicon โดยมีหน่วยเป็น kb)



รูปที่ 3.9 ผลการตรวจประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผ่านการให้ความร้อน 23 ชม โดยคำอธิบายเหมือนกันกับรูปที่ 3.8

ถูกสกัดมาจาก *P. furiosus* โดยตรง) โดยการที่รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase มี PCR efficiency สูงกว่านั้น อาจเนื่องมาจาก His₈-tag และกรดอะมิโนที่เพิ่มมาจากการใช้พลาสมิด pSY5 ก็ได้มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็ได้ จนทำให้มี PCR efficiency มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อสมมติฐานนี้ยังไม่ถูกพิสูจน์ว่าจริงจากการทดลองใด ๆ

จากการทดสอบ PCR efficiency ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผ่านการให้ความร้อน 23 ชม (ซึ่งเป็นเวลาที่นานที่สุดในการทำการให้ความร้อนในงานวิจัยนี้) ผลในรูปที่ 3.9 ได้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์สามารถ amplify PCR product ได้ยาวถึงเพียงแค่ 5 kb เท่านั้น ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าการให้ความร้อนแก่เอนไซม์ ได้ทำให้เอนไซม์ได้สูญเสียประสิทธิภาพ (efficiency) บางส่วนไป

3.7 การตกผลึก (Crystallization) รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

สำหรับ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) จากการทำ crystallization screening ได้แสดงในตารางที่ 3.1 (รูปภาพผลึกในรูปที่ 1ค ในภาคผนวก ค) และจากตารางที่ 3.1 จะเห็นได้ว่า สภาวะส่วนใหญ่ประกอบด้วยเกลือและ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นอยู่ในช่วง 200 - 20,000 และ 10 - 50% ตามลำดับ โดยสภาวะที่ถูกนำมาพิจารณาเพื่อทำการ crystallization optimization คือ OZMA 8K10K: G7, OZMA 1K4K: A7, and CryO I/II: G3 (ภาพของผลึกแสดงในรูปที่ 3.10) โดยส่วนผสมของสารละลายเพื่อทำการ crystallization optimization ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง โดยได้ตั้งชื่อเป็น OPT7, OPT9 และ OPT10 ตามส่วนผสมเริ่มต้นของสภาวะ CryO I/II: G3, OZMA 1K4K: A7 และ OZMA 8K10K: G7 ตามลำดับ ผลการทำการ optimization พบว่าได้ single crystal จำนวนมากจากสภาวะ OPT9-F6 ซึ่งได้จากการเตรียมโดยการเจือจางสารในสภาวะ OZMA 1K4K: A7 [30% (w/v) PEG1000, 200 mM Ammonium Phosphate (monobasic)] ลงไป 40% ด้วยการใช้ 200 mM ammonium phosphate (monobasic), ณ อุณหภูมิ 15 ° โดยความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้นที่ใช้คือ 15 mg/ml และอัตราส่วนของ precipitant ต่อ protein คือ 2:1 [protein:precipitant = 2:1] โดยรูปที่ 3.11 ได้แสดงภาพ single crystal ของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase จากการทดลองนี้ยังพบอีกว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกผลึกของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ดังกล่าวข้างต้นนั้น แตกต่างจากงานวิจัยที่ได้ทำก่อนหน้านี้โดย Goldman, *et al.* (1998)

สำหรับ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) จากการทำ crystallization screening ได้แสดงในตารางที่ 3.2 (รูปภาพผลึกในรูปที่ 2ค ในภาคผนวก ค) และจากตารางที่ 3.2 จะเห็นได้ว่า สภาวะส่วนใหญ่ประกอบด้วยเกลือและ PEG ที่มี molecular weight อยู่ในช่วง 400 - 10,000 และความเข้มข้น 10 - 25% โดย single

crystal ได้เกิดขึ้นในสภาวะ HTS I: G3 ซึ่งประกอบด้วย 10% w/v PEG8000, 100 mM sodium acetate, and 50 mM magnesium acetate, ณ อุณหภูมิ 15 °ซ, protein:precipitant = 2:1, โดยความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้นที่ใช้คือทั้ง 15 และ 20 mg/ml (ซึ่งหลังจากการถูกให้ความร้อนมีการตกตะกอนของโปรตีนเกิดขึ้นและทำให้ความเข้มข้นโปรตีนได้ลดลง 2 - 3 mg/ml โดยส่วนที่ตกตะกอนถูกคิดว่าเป็นโปรตีนอื่น ๆ (protein impurity) ที่ปะปนมา) โดยรูปที่ 3.12 ได้แสดงภาพ single crystal ของ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

การให้ความร้อนกับริคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase อาจทำให้ conformation ของเอนไซม์เปลี่ยนไป เช่น เปลี่ยนจาก โครงสร้างแบบ “ปิด” (“closed” conformation) ไปเป็น โครงสร้างแบบ “เปิด” (“opened” conformation) หรือไม่มีเพียงการเปลี่ยนตำแหน่งหรือ เคลื่อนไหวของ loop (loop movement) ก็เป็นได้ ในทางตรงกันข้าม การให้ความร้อนกับตัวอย่างโปรตีนดังกล่าวซึ่งเป็น โปรตีนที่ทนความร้อน อาจเป็นการกำจัดโปรตีนปลอมปน (protein impurity) ให้กลายเป็นตะกอน (precipitate) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะมีผลต่อการเกิดผลึก จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้สภาวะของการเกิดผลึกของ non-heated และ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase แตกต่างกัน

3.8 การเก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์ (Data collection) จากผลึกของริคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

ข้อมูลเอ็กซ์เรย์ที่ได้จากการหักเห (diffract) แสงเอ็กซ์เรย์ของผลึกของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่มีค่า resolution มากที่สุดเพียง 4 Å ซึ่งได้เท่ากับผลจากการวิจัยของ Goldman, *et al.* (1998) โดยข้อมูลที่มีค่า resolution ระดับนี้จะทำให้การหาโครงสร้างของโปรตีนเป็นไปได้โดยไม่ง่ายคายนักและยังทำให้โครงสร้างโปรตีนที่ได้มีความน่าเชื่อถือน้อย

ส่วนข้อมูลเอ็กซ์เรย์ที่ได้จากการหักเห (diffract) แสงเอ็กซ์เรย์ของผลึกของ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่มีค่า resolution มากที่สุด 3 Å ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการหาโครงสร้างของโปรตีนทั่วไป โดยพบว่า Unit-cell parameters ของผลึกมีค่าเป็น $a = 91.9 \text{ \AA}$, $b = 126.8 \text{ \AA}$, $c = 88.4 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 109.1^\circ$ และ $\gamma = 90.0^\circ$ ที่ให้ค่า Matthew's coefficient เป็น $2.64 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ และ solvent content เท่ากับ 53.5% (v/v) ระบบของผลึกเป็นแบบ Monoclinic และมี space group C2

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) ที่ 15 °ซ สำหรับ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

Screen name	Well no.	Compositions
Ozma 8K10K	A10	20%(w/v) PEG 8000, 200 mM Ammonium sulfite
	B4	20%(w/v) PEG 8000, 200 mM Lithium chloride
	B12	20%(w/v) PEG 8000, 200 mM Magnesium sulfate
	C12	20%(w/v) PEG 8000, 200 mM Sodium chloride
	D5	20%(w/v) PEG 8000, 200 mM Sodium isothiocyanate
	D9	20%(w/v) PEG 8000, 200 mM Sodium sulfate
	E9	10%(w/v) PEG 10,000, 200 mM Ammonium sulfate
	F9	10%(w/v) PEG 10,000, 200 mM Magnesium chloride
	G3	10%(w/v) PEG 10,000, 200 mM Potassium fluoride
	G7*	10%(w/v) PEG 10,000, 50 mM Potassium phosphate (monobasic)
	G8	10%(w/v) PEG 10,000, 200 mM Potassium sulfate
	H9	10%(w/v) PEG 10,000, 200 mM Sodium sulfate
Ozma 1K4K	A7*	30%(w/v) PEG 1000, 200 mM Potassium phosphate (monobasic)
	A12	30%(w/v) PEG 1000, 200 mM Calcium chloride
	C7	30%(w/v) PEG 1000, 200 mM Potassium phosphate (monobasic)
	C8	30%(w/v) PEG 1000, 200 mM Potassium sulfate
	D9	30%(w/v) PEG 1000, 200 mM Sodium sulfate
	E7	20%(w/v) PEG 4000, 200 mM Ammonium phosphate (monobasic)
	E11	20%(w/v) PEG 4000, 200 mM Calcium acetate
	H5	20%(w/v) PEG 4000, 200 mM Sodium isothiocyanate
Cryo I/II	C3	30% (v/v) PEG-400, CAPS pH 10.5, 0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
	D2	40% (v/v) PEG-400, Tris pH 8.5, 0.2 M Li ₂ SO ₄
	D9	20% (v/v) PEG-300, Tris pH 8.5, 5% (w/v) PEG-8000, 10% (v/v) glycerol
	E1	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol cacodylate pH 6.5 5% (w/v) PEG-8000
	G3*	50% (v/v) PEG-200, Tris pH 7.0
	H4	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol, CHES pH 9.5

* Conditions which were considered for crystallization optimization

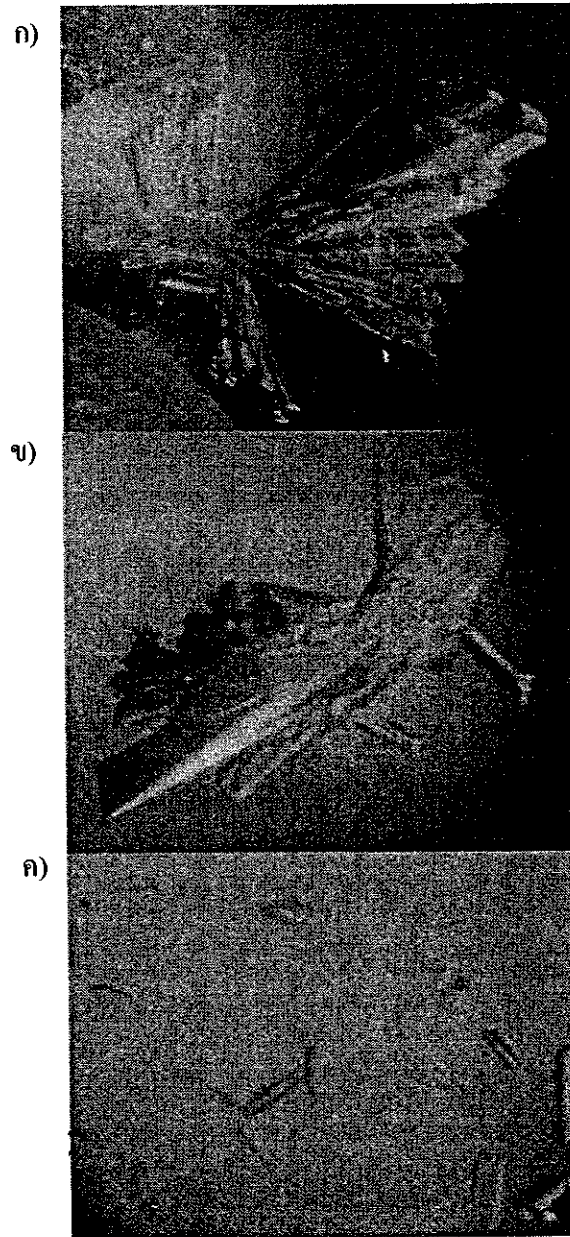
ตารางที่ 3.1 (ต่อ) สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) ที่ 15 °ซ สำหรับ non-heated His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase

Screen name	Well no.	Compositions
The Pegs	A3	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 30 %(v/v) PEG 400
	A4	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 %(v/v) PEG 550 MME
	A5	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 %(w/v) PEG 1000
	A6	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 %(w/v) PEG 2000 MME
	C1	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 %(w/v) PEG 3000
	C2	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 %(w/v) PEG 4000
	C3	0.1 M Sodium acetate pH 4.6 25 %(w/v) PEG 6000
	C4	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 %(w/v) PEG 8000
	C5	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 20 %(w/v) PEG 10000
	C6	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 15 %(w/v) PEG 20000
	G8	0.2 M Magnesium sulfate, 20 %(w/v) PEG 3350
	G11	0.2 M Ammonium sulfate, 20 %(w/v) PEG 3350
	H7	0.2 M Ammonium phosphate, 20 %(w/v) PEG 3350

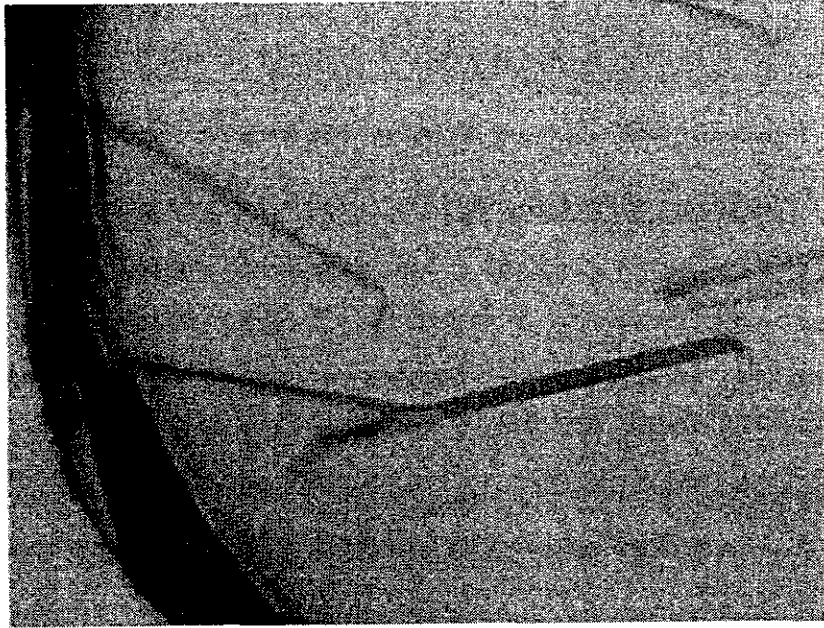
ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมแก่การตกผลึก (crystallization condition) ที่ 15 °ซ สำหรับ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

Screen name	Well no.	Compositions
Ozma 8K10K	B1	20% w/v PEG 8000, 200 mM Diammonium tartrate
	B7	20% w/v PEG 8000, 200 mM Lithium sulfate
	C7	20% w/v PEG 8000, 100 mM Potassium phosphate (monobasic)
	E4	10% w/v PEG 10000, 200 mM Ammonium formate
	F3	10% w/v PEG 10000, 200 mM Lithium Acetate
	G9	10% w/v PEG 10000, 200 mM Potassium thiocyanate
	G11	10% w/v PEG 10000, 200 mM Sodium acetate
	H3	10% w/v PEG 10000, 200 mM Sodium formate
	H5	10% w/v PEG 10000, 200 mM Sodium isothiocyanate
Ozma 1K4K	-	-
HTS I	D11	20% w/v PEG 4000, 10% w/v Glycerol, 200 mM Magnesium sulfate
	D5	10% w/v PEG 4000, 10% w/v 2-Propanol, 100 mM Sodium citrate, pH 5.6
	E3	22% w/v PEG 4000, 100 mM Sodium acetate, 200 mM Ammonium sulfate
	E4	25% w/v PEG 4000, 100 mM Sodium citrate, 200 mM Ammonium sulfate, pH 5.6
	F12	8% w/v PEG 8000, 200 mM Lithium Chloride, 50 mM Magnesium sulfate
	G3 *	10% w/v PEG 8000, 100 mM Sodium Acetate, 50 mM Magnesium Acetate
Cryo I/II	D5	25% (v/v) 1,2-propanediol, phosphate-citrate pH 4.2, 5% (w/v) PEG 3000, 10% (v/v) Glycerol
The Pegs	-	-
WIZARDs I/II	B3	10% (w/v) PEG 3000, imidazole pH 8.0, Lithium sulfate
	B7	20% (w/v) PEG 1000, Tris pH 7.0
	C8	0.4 M NaH ₂ PO ₄ / 1.6 M K ₂ HPO ₄ , imidazole pH 8.0, NaCl
	D7	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol, Na/K phosphate pH 6.2
	D9	20% (w/v) PEG 3000, Acetate pH 4.5
	E8	10% (w/v) PEG 8000, Na/K phosphate pH 6.2, NaCl
Hampton HTP	B6	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 20% w/v PEG 8000
	F10	0.1 M MES pH 6.5, 12% w/v PEG 20000
HTS II	E2	12% (w/v) Ethanol, 4% (w/v) PEG 400, 100 mM Sodium acetate, pH 4.6

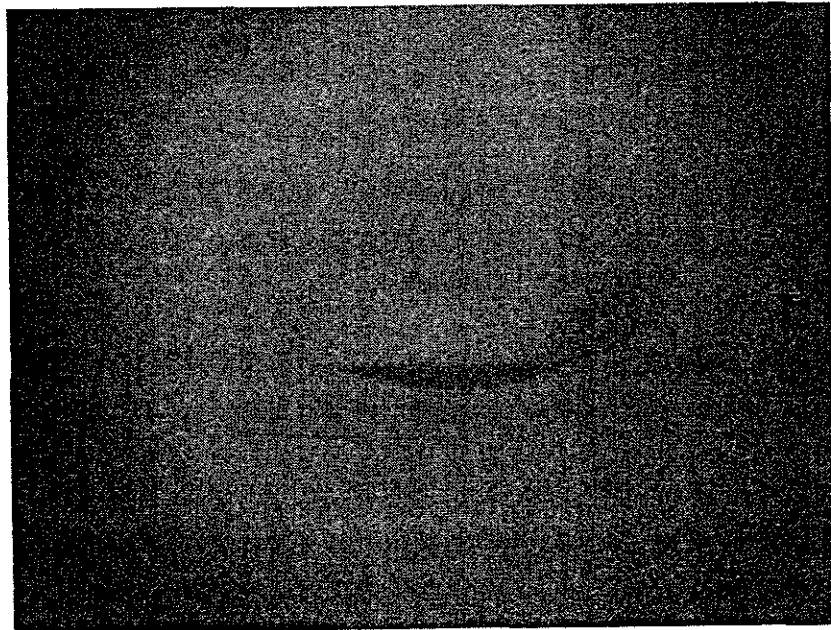
* ณ. สภาวะนี้ มีการเกิดผลึกเดี่ยวสูงที่สุด



รูปที่ 3.10 ผลึกของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ได้จากการทำ crystallization screening ที่สภาวะต่าง ๆ คือ ก) OZMA 8K10K: G7, ข) OZMA 1K4K: A7 และ ค) CryO I/II: G3



รูปที่ 3.11 ตัวอย่าง single crystal ของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ได้จาก optimization สภาวะ OPT9-F6



รูปที่ 3.12 ตัวอย่าง single crystal ของ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ได้จาก optimization สภาวะ HTS I: G3

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. ยีน *Pfu* DNA polymerase ได้ถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pSY5 ที่มีการออกแบบให้มี His8-tag ที่ปลาย N-terminus ของยีน *Pfu* DNA polymerase ที่ถูกโคลนนี้ได้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ด้วยการทำให้ Nested PCR โดย primer 2 ชุด (คือ ชุดที่ 1 ไม่มี และ ชุดที่ 2 มี restriction sites) และผลการทำ DNA sequencing พบว่า ยีน *Pfu* DNA polymerase ที่ถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิด pSY5 นั้น มีลำดับเบสเหมือนกับยีนต้นแบบที่ได้มาจากฐานข้อมูลทุกลำดับเบส

2. จากการเปรียบเทียบการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His8-tagged *Pfu* DNA polymerase ขนาดย่อม (small-scale expression) ใน *E. coli* 2 สายพันธุ์ คือ Rosetta (DE3) pLysS และ BL21-Codonplus (DE3)-RIL พบว่ามีการผลิต *Pfu* DNA polymerase มากที่สุดใน *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS ด้วยการเหนี่ยวนำที่ 25 °C นาน 18 ชม และสถานะนี้ได้ถูกเลือกใช้ในการผลิตในขนาดที่ใหญ่ขึ้น (scale-up)

3. รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ถูกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยระบบอัตโนมัติ AKTAXpress Purification System และมีโปรตีน yield เท่ากับ 38 mg/L โดยความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ และเหมาะสมต่อการตกผลึก

4. Relative DNA polymerase activity ได้จากการเปรียบเทียบความเข้มของ PCR product band (band intensity) ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ผลิตในงานวิจัยนี้ เทียบกับการใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase จากบริษัท Promega ทำให้ได้ว่า เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase มี activity 30,000 U/mg protein

5. รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ยังคงทนทาน และสามารถทำงานได้แม้หลังจากการให้ความร้อนสูงเป็นเวลานานมากถึง 23 ชม ซึ่งเป็นเวลาที่มากที่สุดที่ใช้ในการทดสอบการทนความร้อนในงานวิจัยนี้

6. รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase มีประสิทธิภาพทาง PCR (PCR efficiency) สูงกว่า commercial Promega *Pfu* DNA polymerase และการให้ความร้อนแก่เอนไซม์ทำให้เอนไซม์ได้สูญเสียประสิทธิภาพ (efficiency) บางส่วนไป

7. Single crystal จำนวนมากได้เกิดขึ้นที่สถานะ OPT9-F6 ซึ่งได้จากการเตรียมโดยการเจือจางสารในสถานะ OZMA 1K4K: A7 [30% (w/v) PEG1000, 200 mM Ammonium Phosphate (monobasic)] ลงไป 40% ด้วยการใส่ 200 mM ammonium phosphate (monobasic) ในขณะที่ single

crystal ได้เกิดขึ้นในสภาวะ HTS I: G3 ซึ่งประกอบด้วย 10% w/v PEG8000, 100 mM sodium acetate, and 50 mM magnesium acetate โดยการตกผลึกของโปรตีนทั้งสองชนิดนั้น เตรียมโดยใช้เทคนิค vapor diffusion-sitting drop ที่ 15 °ซ และมี protein:precipitant = 2:1

8. ข้อมูลเอ็กซ์เรย์ที่ได้จากการหักเห (diffract) แสงเอ็กซ์เรย์ของผลึกของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่มีค่า resolution มากที่สุด 4 Å ส่วนข้อมูลเอ็กซ์เรย์ที่ได้จากการหักเห (diffract) แสงเอ็กซ์เรย์ของผลึกของ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่มีค่า resolution มากที่สุด 3 Å โดยพบว่า Unit-cell parameters ของผลึกมีค่าเป็น $a = 91.9 \text{ \AA}$, $b = 126.8 \text{ \AA}$, $c = 88.4 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 109.1^\circ$, and $\gamma = 90.0^\circ$ ที่ให้ค่า Matthew's coefficient เป็น $2.64 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ และ solvent content เท่ากับ 53.5% (v/v) ระบบของผลึกเป็นแบบ Monoclinic และมี space group C2

ในภาพโดยรวมแล้ว เอนไซม์ thermostable *Pfu* DNA polymerase ได้ถูกโคลน, sequence, ผลิต และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการของเราเองที่มีการใช้เอนไซม์นี้เป็นจำนวนมาก โดยนอกจากจะได้ใช้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า Promega *Pfu* polymerase แล้วยังสามารถลดค่าใช้จ่ายลงได้อย่างมากอย่าง หลังจากการทำ crystallization screening และ optimization แล้วก็ได้สภาวะที่ทำให้เกิด single crystal ของ non-heated และ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase นอกจากนี้ single crystal ดังกล่าว ก็ได้ถูกใช้เก็บข้อมูลเอ็กซ์เรย์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว แต่อย่างไรก็ตาม โครงสร้างจะต้องทำการ solve จากข้อมูลเอ็กซ์เรย์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การทำ crystallization optimization จากสภาวะอื่น ๆ (นอกจากที่ได้ทำแล้วในงานวิจัยนี้) ที่พบจากการทำ crystallization screening เพื่อให้ได้ผลึกที่สามารถหักเหแสงเอ็กซ์เรย์ได้ที่ resolution สูงขึ้น กล่าวคือ ได้สูงกว่า 4 Å ในกรณีของ non-heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase หรือ สูงกว่า 3 Å ในกรณีของ heated His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase
2. เพื่อศึกษา enzyme-DNA binding จะต้องทำการตกผลึกในรูปของ “complex” ซึ่งอาจทำได้โดยเทคนิคการทำ “co-crystallization” หรือ “crystal soaking”
3. การเปรียบเทียบโครงสร้างของ *Pfu* DNA polymerase กับ DNA polymerase อื่น ๆ อย่างถี่ถ้วนอาจทำได้เพื่อให้เข้าใจหน้าที่, ความทนทานต่อความร้อนและ fidelity ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ เนื่องจากไม่ได้รับเงินอุดหนุนต่อเนื่องในปีที่ 2

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Bergfors, T. M. (1999). **Protein crystallization: techniques, strategies, and tips**. California: International university line.
- Blow, D. (2002). **Outline of crystallography for biologist**. New York: Oxford university press.
- Cline, J., Braman, C. J. and Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Res.** 24(18): 3546-3551.
- Dabrowski, S. and Kur, J. (1998). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant His-tagged DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. **Protein Expression and Purif.** 14: 131-138.
- Eckert, K. A., and Kunkel, T. A. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. **PCR Methods Appl.** 1: 17-24.
- Elie, C., de Recondo, A. M., and Forterre, P. (1989). Thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification, characterization and immunological properties. **Eur. J. Biochem.** 178: 619-626.
- Goldman, S., Kim, R., Hung, L. W., Jancarik, J. and Kim, S. H. (1998). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase. **Acta Crystallogr.** D54: 986-988.
- Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T. and Kai, Y. (2001). Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. **J Mol Biol.** 306(3):469-477.
- Hopfner, K. P., Eichinger, A., Engh, R. A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. and Angerer, B. (1999). Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 96(7):3600-3605.
- Ito, J., and Braithwaite, D. K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerases. **Nucleic Acids Res.** 19: 4045-4057.
- Klimczak, L. J., Grummt, F., and Burger, K. J. (1985). Purification and characterization of DNA polymerase from archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. **Nucleic Acids Res.** 13: 5269-5282.
- Lu, C. and Erickson, P. H. (1997). Expression in *Escherichia coli* of the thermostable DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. **Protein Expression and Purif.** 11: 179-184.

- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A., and Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene**. 108: 1-6.
- Mathur, E. J., Adams, M. W. W., Callen, W. N., and Cline, J. (1991). The DNA polymerase gene from the hyperthermophilic marine archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, shows sequence homology with alpha-like DNA polymerases. **Nucleic Acids Res.** 19: 6952.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. **J. Mol. Biol.** 33: 491-497.
- Moss, D. S. (1985). The symmetry of the rotation function. **Acta Crystallogr.** A41: 470-475.
- Mroczkowski, B. S., Huvar, A., Lernhardt, W., Misono, K., Nielson, K., and Scott, B. (1994). Secretion of thermostable DNA polymerase using a novel baculovirus vector. **J. Biol. Chem.** 269: 13522-13528.
- Perler, F. B., Comb, D. G., Jack, W. E., Moran, L. S., Qiang, B., Kucera, R. B., Benner, J., Slatko, B. E., Nwankwo, D. O., Hempstead, S. K., Carlow, C. K. S., and Jannash, H. (1992). Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 5577-5581.
- Rella, R., Raia, C. A., Pisani, F. M., D'Auria, S., Nucci, R., Gambacorta, A., de Rosa, M., and Rossi, M. (1990). Purification and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. **Ital. J. Biochem.** 39: 83-99.
- Rhodes, G. (2006). **Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models** (3rd ed). California: Academic press.
- Rhodes, G. (2006). **Resources for Readers of Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models** [online]. Available: <http://www.usm.maine.edu/~rhodes/CMCC/>
- Rodriguez, A. C., Park, H. W., Mao, C. and Beese, L. S. (2000). Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sp.* 9 degrees N-7. **J Mol Biol.** 299(2):447-62.
- Uemori, T., Ishino, Y., Toh, H., Asada, K. and Kato, I. (1993). Organization and nucleotide of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Nucleic Acids Res.** 21(2): 259-265.

- Wang, J., Sattar, A. K. M. A., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H. and Steiz, T. A. (1997). Crystal structure of a pol a family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell*. 89: 1087-1099.
- Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Moarefi, I., Leighton, L., Lasken, R. and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase. *Structure*. 7(10):1189-1199.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ HIS₈-TAGGED *PFU* DNA POLYMERASE

atggcagaagaacaccaccaccaccaccaccacactggaagttctgttccaggggcc
M A E E H H H H H H H L E V L F Q G P
ggcgccgatgatttttagatgtggattacataactgaagaaggaaaacctgttattagg
G R P M I L D V D Y I T E E G K P V I R
ctattcaaaaaagagaacggaaaatttaagatagagcatgatagaacttttagaccatac
L F K K E N G K F K I E H D R T F R P Y
atttacgctcttctcagggatgattcaaagattgaagaagttaagaaaataacgggggaa
I Y A L L R D D S K I E E V K K I T G E
agggatggaagattgtgagaattgttgatgtagagaaggttgagaaaaagtttctcggc
R H G K I V R I V D V E K V E K K F L G
aagcctattaccgtgtggaaactttatttggaaacatccccaagatgttcccactattaga
K P I T V W K L Y L E H P Q D V P T I R
gaaaaagtttagagaacatccagcagttgtggacatcttcgaatac gatattccatttga
E K V R E H P A V V D I F E Y D I P F A
aagagatacctcatcgacaaaggcctaataccaatggagggggaagaagagctaaagatt
K R Y L I D K G L I P M E G E E E L K I
cttgccctcgatatagaaacctctatcacgaaggagaagagtttggaaaaggcccaatt
L A F D I E T L Y H E G E E F G K G P I
ataatgattagttatgcagatgaaaatgaagcaaaggtgattacttggaaaaacatagat
I M I S Y A D E N E A K V I T W K N I D
cttccatacgttgaggttgtatcaagcgagagagatgataaagagatttctcaggatt
L P Y V E V V S S E R E M I K R F L R I
atcagggagaaggatcctgacattatagttacttataatggagactcattcgacttccca
I R E K D P D I I V T Y N G D S F D F P
tatttagcgaagggcagaaaaacttgggattaaattaaccattggaagagatggaagc
Y L A K R A E K L G I K L T I G R D G S
gagcccaagatgcagagaataggcgatagacggctgtagaagtcaaggggaagaatacat
E P K M Q R I G D M T A V E V K G R I H
ttcgacttgtatcatgtaataacaaggacaataaatctcccaacatacacactagaggct
F D L Y H V I T R T I N L P T Y T L E A
gtatatgaagcaatttttggaaagccaaaggagaaggtatacgcgcgagatagcaaaa
V Y E A I F G K P K E K V Y A D E I A K
gcctgggaaagtggagagaaccttgagagagttgccaataactcgatggaagatgcaag
A W E S G E N L E R V A K Y S M E D A K
gcaacttatgaactcgggaaagaattccttccaatggaaattcagctttcaagattagtt
A T Y E L G K E F L P M E I Q L S R L V
ggacaacctttatgggatgtttcaaggtcaagcacagggaaaccttgtagagtggttctta
G Q P L W D V S R S S T G N L V E W F L
cttaggaaagcctacgaaagaacgaagtagctccaaacaagccaagtgaagaggagat
L R K A Y E R N E V A P N K P S E E E Y
caaagaaggctcagggagagctacacaggtggattcgttaagagccagaaaaggggttg
Q R R L R E S Y T G G F V K E P E K G L
tgggaaacatagatatacctagatttttagagccctatatccctcgattataattaccac
W E N I V Y L D F R A L Y P S I I I T H
aatgtttctccgataactctaaatcttgagggatgcaagaactatgatatcgctcctcaa
N V S P D T L N L E G C K N Y D I A P Q
gtaggccacaagttctgcaaggacatccctggttttataccaagtctcttgggacattg
V G H K F C K D I P G F I P S L L G H L
ttagaggaaagacaaaagattaagacaaaatgaaggaaactcaagatcctatagaaaa
L E E R Q K I K T K M K E T Q D P I E K

atactccttgactatagacaaaaagcgataaaaactccttagcaaattcctttctacggatat
 I L L D Y R Q K A I K L L A N S F Y G Y
 tatggctatgcaaaagcaagatggactgtaaggagtgtgctgagagcgttactgcctgg
 Y G Y A K A R W Y C K E C A E S V T A W
 ggaagaaagtacatcgagtttagtatggaaggagctcgaagaaaagtttgatttaaagtc
 G R K Y I E L V W K E L E E K F G F K V
 ctctacattgacactgatggctctctatgcaactatcccaggaggagaaagtgaggaaata
 L Y I D T D G L Y A T I P G G E S E E I
 aagaaaaaggctctagaatttgtaaaatacataaattcaaagctccctggactgctagag
 K K K A L E F V K Y I N S K L P G L L E
 cttgaatatgaagggttttataagaggggattcttcggttacgaagaagaggtatgcaagta
 L E Y E G F Y K R G F F V T K K R Y A V
 atagatgaagaaggaaaagtcattactcgtgggttagagatagttaggagagattggagt
 I D E E G K V I T R G L E I V R R D W S
 gaaattgcaaaagaaaactcaagctagagttttggagacaataactaaaacacggagatggt
 E I A K E T Q A R V L E T I L K H G D V
 gaagaagctgtgagaatagtaaaagaagtaatacaaaaagcttgccaattatgaaattcca
 E E A V R I V K E V I Q K L A N Y E I P
 ccagagaagctcgcaatatatgagcagataacaagaccattacatgagtataaggcgata
 P E K L A I Y E Q I T R P L H E Y K A I
 ggtcctcacgtagctgttgcaaagaaactagctgctaaaggagttaaaataaagccagga
 G P H V A V A K K L A A K G V K I K P G
 atggtaattggatacatagtagtagggcgatggccaattagcaatagggcaattcta
 M V I G Y I V L R G D G P I S N R A I L
 gctgaggaatacgcatacccaaaaagcacaagtatgacgcagaatattacattgagaaccag
 A E E Y D P K K H K Y D A E Y Y I E N Q
 gttcttccagcggtagtaggatattggagggatttgatacagaaaggaagacctcaga
 V L P A V L R I L E G F G Y R K E D L R
 taccaaaagacaagacaagtcggcctaacttctcctggcttaacattaaaaaatcctag
 Y Q K T R Q V G L T S W L N I K K S *

รูปที่ 1ก ลำดับเบสของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ถูกโคลน ส่วนที่
 ไฮไลต์เป็นนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนที่เพิ่มมาจาก *Pfu* DNA polymerase ต้นแบบ หลังจากที่มี
 การโคลนเข้าสู่ พลาสมิด pSY5

* แสดงถึง Stop codon

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่า RELATIVE DNA POLYMERASE ACTIVITY

การคำนวณค่า relative DNA polymerase activity ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase

จากรูปที่ 1x อัตราส่วนของความเข้ม DNA band ใน lane 2 ต่อ lane 8 เท่ากับ:

$$\frac{734.440}{361.870} = 2.03 \approx 2$$

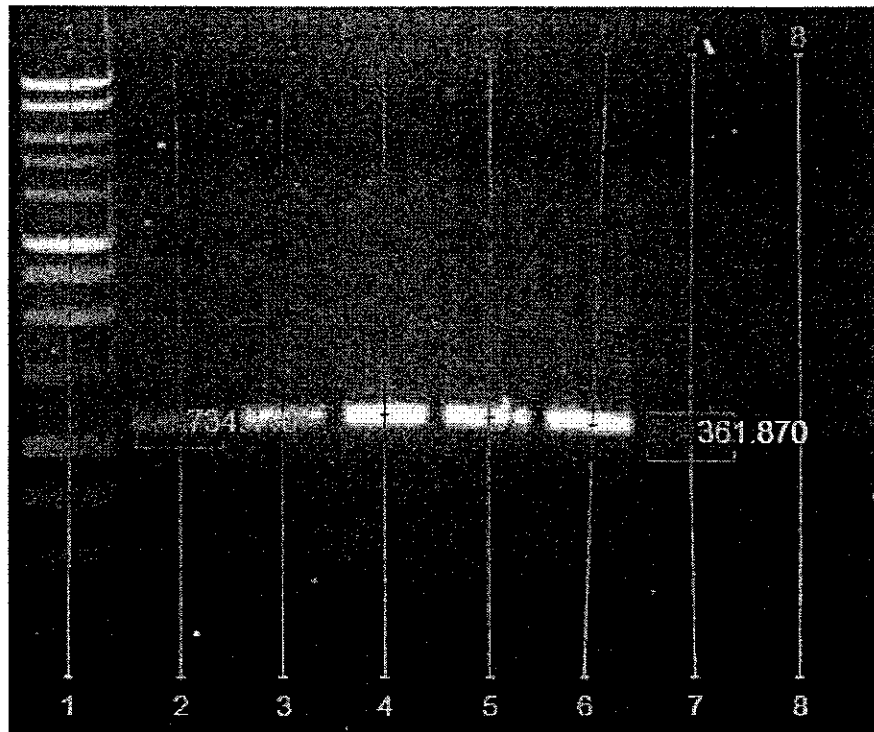
จะได้ว่า 0.2 μ g ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase มี relative polymerase activity เท่ากับ:

$$2 \times 3 \text{ U} = 6 \text{ U}$$

และ 1 mg ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase มี relative polymerase activity เท่ากับ:

$$\left| \frac{6 \text{ U}}{0.2 \mu\text{g}} \right| \left| \frac{1 \mu\text{g}}{10^{-3} \text{ mg}} \right| = 30,000 \text{ U}$$

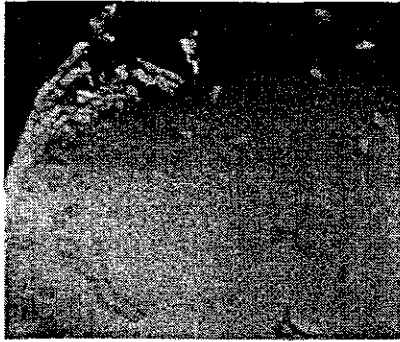
ฉะนั้น relative polymerase activity ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₈-tagged *Pfu* DNA polymerase คือ 30,000 U ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (30,000 U/mg)



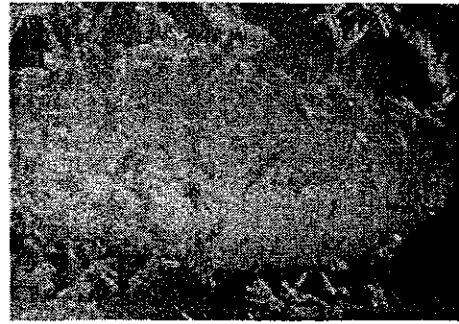
รูปที่ 1 ข ความเข้มของ DNA band (หน่วย: arbitrary unit) ที่ได้จากการใช้โปรแกรม Quantity One® Software โดยตัวเลขบน lane 2 และ lane 8 แสดงค่าความเข้มของ DNA band เมื่อใช้ 0.2 μg ของ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase และ 3 U ของ commercial Promega *Pfu* DNA polymerase ตามลำดับ

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างของผลึกจากการทำ CRYSTALLIZATION SCREENING



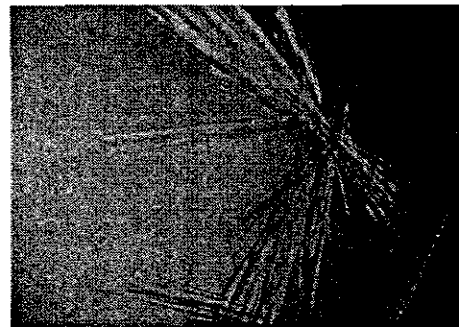
The Pegs: A5



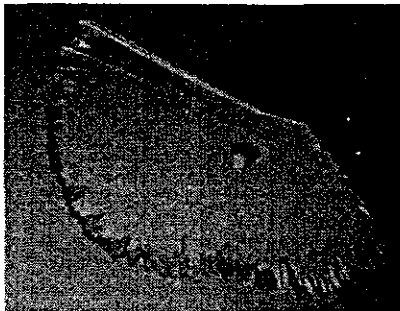
OZMA 1K4K: H9



OZMA 1K4K: E11



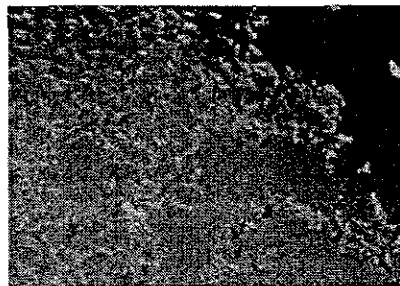
Cryo I/II: A1



The Pegs: A4

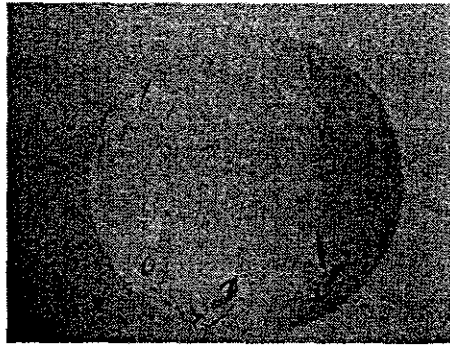


OZMA 1K4K: E12

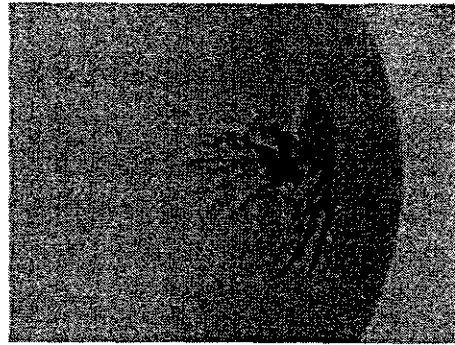


OZMA 8K10K: B4

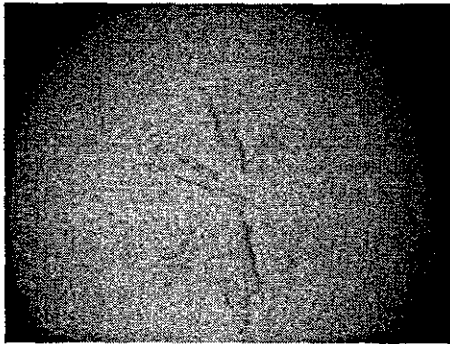
รูปที่ 1ค ตัวอย่างผลึกของโปรตีนชนิด non-heated His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ได้จากสภาวะต่าง ๆ จากการทำ crystallization screening



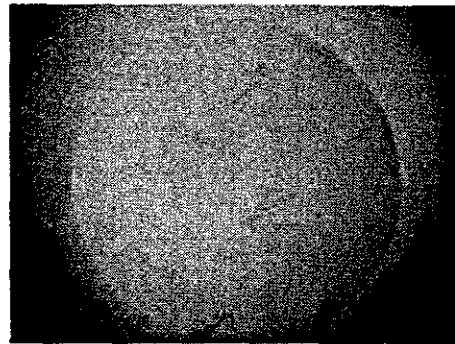
OZMA 8K10K: F3



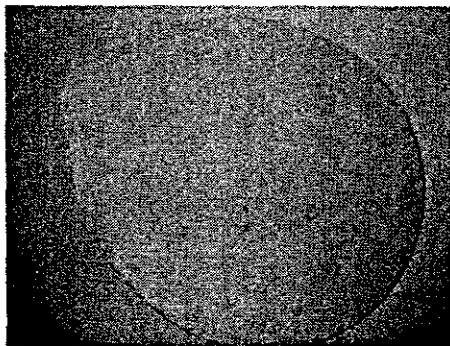
OZMA 8K10K: G11



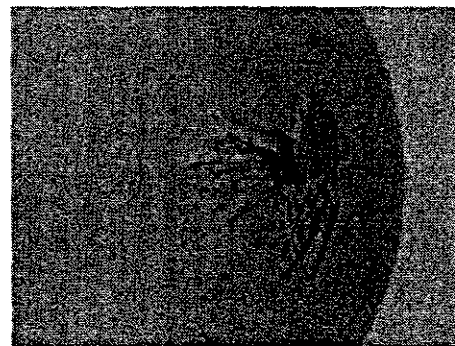
HTS I: F12



HTS I: D11



Cryo I/II: D5



OZMA 8K10K: G11

รูปที่ 2ค ตัวอย่างผลึกของโปรตีนชนิด heated His₆-tagged *Pfu* DNA polymerase ที่ได้จากสภาวะต่าง ๆ จากการทำ crystallization screening

ภาคผนวก ง

ส่วนผสมของสารละลายในการทำ CRYSTALLIZATION OPTIMIZATION

ตารางที่ 14 ส่วนผสมของสารละลายในการทำ crystallization optimization จากสถานะ OPT7 (ดัดแปลงมาจากสถานะเริ่มต้น CryO I/II: G3)

Name	Formulation
OPT7-F1	50 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 6.8
OPT7-F2	50 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 6.9
OPT7-F3	50 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.0
OPT7-F4	50 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.1
OPT7-F5	50 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.2
OPT7-F6	50 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.3
OPT7-F7	45 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 6.8
OPT7-F8	45 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 6.9
OPT7-F9	45 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.0
OPT7-F10	45 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.1
OPT7-F11	45 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.2
OPT7-F12	45 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.3
OPT7-F13	35 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 6.8
OPT7-F14	35 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 6.9
OPT7-F15	35 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.0
OPT7-F16	35 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.1
OPT7-F17	35 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.2
OPT7-F18	35 % PEG200, 100 mM Tris HCl, pH 7.3

ตารางที่ 2ง ส่วนผสมของสารละลายในการทำ crystallization optimization จากสถานะ OPT9
(ดัดแปลงมาจากสถานะเริ่มต้น Ozma 1K4K: A7)

Name	Formulation
OPT9-F1	90 % of OPT9 ^a with 200 mM ammonium phosphate (monobasic)
OPT9-F2	80 % of OPT9 ^a with 200 mM ammonium phosphate (monobasic)
OPT9-F3	70 % of OPT9 ^a with 200 mM ammonium phosphate (monobasic)
OPT9-F4	60 % of OPT9 ^a with 200 mM ammonium phosphate (monobasic)
OPT9-F5	50 % of OPT9 ^a with 200 mM ammonium phosphate (monobasic)
OPT9-F6	40 % of OPT9 ^a with 200 mM ammonium phosphate (monobasic)
OPT9-F7	80 % of OPT9 ^a with water
OPT9-F8	70 % of OPT9 ^a with water
OPT9-F9	60 % of OPT9 ^a with water
OPT9-F10	50 % of OPT9 ^a with water
OPT9-F11	40 % of OPT9 ^a with water
OPT9-F12	90 % of OPT9 ^a with water

^aOPT9 contains 30 % PEG1000 and 200 mM ammonium phosphate (monobasic)

ตารางที่ 3ง ส่วนผสมของสารละลายในการทำ crystallization optimization จากสถานะ OPT10
(ดัดแปลงมาจากสถานะเริ่มต้น Ozma 8K10K: G7)

Name	Formulation
OPT10-F1	90 % of OPT10 ^b with 50 mM potassium phosphate (monobasic)
OPT10-F2	80 % of OPT10 ^b with 50 mM potassium phosphate (monobasic)
OPT10-F3	70 % of OPT10 ^b with 50 mM potassium phosphate (monobasic)
OPT10-F4	60 % of OPT10 ^b with 50 mM potassium phosphate (monobasic)
OPT10-F5	50 % of OPT10 ^b with 50 mM potassium phosphate (monobasic)
OPT10-F6	40 % of OPT10 ^b with 50 mM potassium phosphate (monobasic)

^bOPT10 contains 10 % PEG10,000 and 50 mM potassium phosphate (monobasic)

- The Study for Optimum Production Conditions of Recombinant Proteins in Bioreactor, แล้วเสร็จ 2549
- Production of Tilapia Transglutaminase แล้วเสร็จ 2549
- Expression and Production of β -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris* แล้วเสร็จ 2548
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl แล้วเสร็จ 2547
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm แล้วเสร็จ 2546
- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe แล้วเสร็จ 2543
- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase แล้วเสร็จ 2541

7.3 ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses แล้วเสร็จ 2545
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. (National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) แล้วเสร็จ 2549

7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

ดู หัวข้อ 7.2 และ 7.3

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :

- Search for new Glycosyl hydrolases and theirs expression in KDML Rice
สถานภาพในการทำวิจัย :
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 60%
- Development of biological probes to assure traceability of tilapia from the North East of Thailand
สถานภาพในการทำวิจัย :
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 80%

Publications:

- Muenthaisong S, Laowtammathron C, Ketudat-Cairns M, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology*. 67(4) 893-900
- Toonkool, P., Methenukul, P., Sujiwattarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., Ketudat-Cairns, M., Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a α -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. *Protein Expression and Purification* (48) 195-204

- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process Biochemical Engineering Journal. (30) 205-211.
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant \square -glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. Journal of Biotechnology (122) 86-98
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering (27) 399-406 ** Received Best paper of the year award. **
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M.**, Hochi, S., Pampai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology (64) 1185-1196
- Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5 (1) 51-55
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* 16: 149.
- Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. Thai J. of Biot 2 (1): 55-62
- Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). Plant Molec. Biol.41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)
- Ketudat-Cairns, M.** (1998) Biotechnology and Daily Life. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100
- Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings
- Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700
- Ueda T, Wawerczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709

Paper Presented at National and International Conferences

- Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M.** Bovine Enterokinase light chain production (Oral presentation) The 2nd International Conference on “Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products” 23-25 May 2007 Khon Kaen, Thailand,
- Nakphaichit, M., Ketudat-Cairns, J. and **Ketudat-Cairns, M.** Characterization of β -glucosidase from rice *SFR2* gene (Oral presentation) The annual meeting of science and technology master research grant Thailand Research Fund 20-22 April 2007 Chonburi Thailand
- Nakphaichit, M., Opassiri, R., Akiyama, T. and **Ketudat-Cairns, M.** Expression of rice β -glucosidase in bacteria, yeast and plant cell. (Oral presentation) The KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST) “Biological Diversity, Food and Agricultural Technology” April, 26-27, 2007 Bangkok, Thailand

- Kumpong, O. and **Ketudat-Cairns, M.** Cloning of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Transglutaminase cDNA (Oral presentation) The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok Thailand
- Wanthanalert, W. and **Ketudat-Cairns, M.** Double Recombination in pHELLSGATE 8 RNAi Vector. (Poster presentation) The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok Thailand
- Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Thangthai, C., Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*bubalus bubalis*) and bovine (*bos taurus*) embryos (Poster presentation) The 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference 29 Nov- 3 Dec 2006 Hanoi, Vietnam
- Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Somsa, W., Kongsila, A., Kretapol, K., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. Development of interspecies cloned long tailed monkey (*macaca fascicularis*) embryos after reconstructed with bovine enucleated oocyte and culturing in different condition (Poster presentation) The 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference 29 Nov- 3 Dec 2006 Hanoi, Vietnam
- Imsoonthornruksa, S, Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Kretapol, K., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. Dedifferentiation of marbled cat (*pardofelis marmorata*) nuclei after reconstructed with enucleated domestic cat and bovine oocytes (Poster presentation) The 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference 29 Nov- 3 Dec 2006 Hanoi, Vietnam *Received Excellent Poster Award*
- Charoenrat, T., S-O., Enfors and **Ketudat-Cairns, M.** Increased Oxygen Transfer Enhanced Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris* Processes (Oral Presentation) Proceeding of the 18th Thai Society for Biotechnology Annual meeting 2-3 Nov 2006, Bangkok, Thailand
- Loonchanta, A., Chumnarnsilpa, S., Robinson, R., and **Ketudat-Cairns, M.** Cloning and Expression of Archaeon *Pyrococcus furiosus* Thermostable DNA Polymerase in *Escherichia coli* (Poster Presentation) Proceeding of the 18th Thai Society for Biotechnology Annual meeting 2-3 Nov 2006, Bangkok, Thailand
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Somsa, W., Kongsila, A., Kretapol, K., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. In vitro Development of ISCNT Produced Long Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryos (Poster presentation) Proceeding of the 18th Thai Society for Biotechnology Annual meeting 2-3 Nov 2006, Bangkok, Thailand
- Kupradit, C. and **Ketudat-Cairns, M.** Buffalo Enterokinase Light Chain Cloning (oral Presentation) The 6th National Symposium on Graduate Research, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand 23-24 Oct 2006
- Nakphaichit, M. and **Ketudat-Cairns, M.** Lack of Expression of Recombinant Rice *B*-Glucosidase *SFR2* in *Escherichia coli* (Poster Presentation) The 6th National Symposium on Graduate Research, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand 23-24 Oct 2006
- Parnpai, R., Muenthaisong, S., Suteevan, T., Na-Chiangmai, A., Laowtammathorn, C., Lorthongpanich, C., Sanghuayphrai, N., and **Ketudat-Cairns, M.** Productions of Swamp Buffalo Embryos: Comparison of *in vitro* Fertilization and Somatic Cell Nuclear Transfer Techniques. (Oral presentation) The 5th Asian Buffalo Congress on Social Economic Contribution of Buffalo to Rural Areas. 18-22 April 2006 Nanning, China
- Sang-Ngam, C., Imsoonthornruksa, S., Thangthai, C., Srirattana, K., Tunwattana, W., Muenthaisong, S., Laowtammathorn, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. Inter-Species Nuclear Transfer Using Female and Male Guar (*Bos Gaurus*) Skin Fibroblasts Reconstructed with Enucleated Bovine Oocytes. (Poster presentation) The 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference "Innovation for Life" 2-7 November 2005 Bangkok, Thailand
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic, M., Enfors, S.-O. and Veide, A. (2005) Comparison of novel type Streamline Direct CST1 adsorbent with Streamline SP for recovery of recombinant *b*-glucosidase from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. (Poster presentation) The 13th International Conference on Biopartitioning and Purification (BPP2005) During June 20 - 24, 2005 at Amsterdam, Netherland.

- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O. and Veide, A. Recombinant α -Glucosidase Production by *Pichia pastoris* and Recovery by Expanded Bed Adsorption (Poster presentation) 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural products 22-25 March 2005 Khon Kaen University Thailand
- Charoenrat, T., Enfors S.-O., Jahic M., **Ketudat-Cairns M.** and Veide A. (2004). Recombinant α -glucosidase Production in *Pichia pastoris* and Recovery by Expanded Bed Adsorption. (poster presentation). The Swedish Forest Biotechnology Conference (SFBC). 11-12 November, 2004. Stockholm, Sweden
- Ketudat-Cairns JR, Opassiri R, Chantarangsee M, Cheunchor W, Onkoksoong T, Pomthong B, Akiyama T, **Ketudat-Cairns M**, Svasti J (2004) Molecular and enzymatic characterization of α -glycosidases from rice, *Oryza sativa L.* (invited lecture) 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / A-IMBN Meeting on Genomics and Health in the 21st Century, Bangkok, Thailand, 22-26 November, 2004. Presentation IL-C2.
- Ketudat-Cairns JR, Opassiri R, **Ketudat-Cairns M**, Chantarangsee M, Cheunchor W, Onkoksoong T, Pomthong B (2004) Investigation of rice beta-glycosidase gene functions. (invited lecture) First International Conference on Rice for the Future, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 31 August-3, Sept., 2004. Proceedings pg. 106.
- Opassiri R, Chuankhayan P, Chantarangsee M, Chuenchor W, Onkoksoong T, Mothong N, Pomthong B, Methenukul P, Kontong T, **Ketudat-Cairns M**, Toonkool P, Akiyama T, Svasti J, Ketudat Cairns JR (2004) Expanding the repertoire of α -glycosidases with *Dalbergia nigrescens* and rice enzymes. (invited lecture) Joint Senior Research Scholar Meeting "Integration of Biological Science, Protein Chemistry and Medicine. Mahidol University, Bangkok, Thailand, 14-15 Sept., 2004. Proceedings pg. 8.
- Ketudat-Cairns JR, Opassiri R, **Ketudat-Cairns M**, Chantarangsee M, Onkoksoong T, Chuenchor W, Akiyama T, Svasti J (2004) Functional genomics of rice beta-glycosidase genes. (poster presentation) The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress: Evolving Genetics and its Global Impact. Bangkok, Thailand 16-20 August, 2004. Proceeding Volume II PJ-07, pg 144.
- Singhapol, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Genetic Characterization of Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*) Based on Microsatellite Polymorphism Proceeding of the 15th Thai Society for Biotechnology Annual meeting Feb 4-6th, Chaing Mai, Thailand
- Charoenrat, T., M. Jahic, H. Stendahl-Andersen, S.-O., Enfors and **Ketudat-Cairns** (2004) Recombinant α -glucosidase production by *Pichia pastoris*: The effect of temperature Proceeding of the 15th Thai Society for Biotechnology Annual meeting Feb 4-6th, Chaing Mai, Thailand
- Singhapol, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2003) Microsatellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*) Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar & Symposium 2003, Role of Asia in the World, Oct. 18-21 Mie Univ., Tsu, Mie, Japan
- Charoenrat, T. and **Ketudat-Cairns** (2003) Influence of pH on Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris* Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Loonchanta, A. and **Ketudat-Cairns** (2003) Primer Design for Amplification of Transglutaminase Gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Singhapol, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2003) Microsatellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*).. Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

- Loonchanta, A., Chumnarnsilpa S., and Ketudat-Cairns, M. (2002) Comparison of recombinant β -glucosidase production by *Pichia pastoris* in stirred and air-lift bioreactor. Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2002) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (poster presentation)
- Manatriron S., Na Lampang P., Likitdecharote B., Phalaraksh K., Ketudat-Cairns M. and Duangjinda M. (2002) The Association of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 (BoLA-DRB3.2) Alleles with Occurrence of Clinical Mastitis in Dairy Cattle Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)
- Chumnarnsilpa, S., Ketudat-Cairns, M. and Boonkerd, N. (2001) Growth kinetic of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and killer toxin production in wine making Poster presentation, Biothailand, , 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Poster presentation, Biothailand, 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Srilunchang, K., Khumlert, R. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper*. Poster presentation, Second Graduate conference, Mahidol University, Bangkok
- Ngamjun, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Ketudat-Cairns, M. (2000). Tilapia sex chromosome identification DNA probe. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P206-211.
- Ngamjan, P., Boonanantanasarn, S. and Ketudat-Cairns, M. (1999) Tilapia Sex Chromosome Identification using DNA Probe. Poster presentation, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, Phuket, Thailand
- Ketudat-Cairns, M. Boonanantanasarn, S. and Ngamjan, P. (1998) Paper presentation The Development of Tilapia Sex chromosome Identification System, Biotech forum, Biotechnology for Aquaculture National Science and Technology Development Agency, Bangkok Thailand.
- Ketudat-Cairns, M. (1996) Renovating Technologies for Crop Quality. Paper presentation, The Third Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology: Issue and Choices, Prachuab Khirikhan, Thailand
- Ketudat-Cairns, M. and Schmidt, R. J. (1995) Functional Analyses of the Maize bZIP protein Opaque-2. Paper presentation, International Conference on Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development, Bangkok, Thailand
- Parsons, R. L., Ketudat-Cairns, M., Pysh, L. D., and Schmidt, R. J. (1995) Opaque-2, OHP and OBP Transcriptional Activator in Maize Endosperm. Poster presentation, The 37th Annual Maize Genetics Conference, Pacific Grove, California, USA
- Ketudat, M., and Schmidt, R. J. (1992) Analysis of Opaque-2 Function. Poster presentation, Molecular Crop Agriculture for the Pacific Rim, University of California Davis, California, USA
- Aukerman, M. J., Ketudat, M., Parsons, R. L., Pysh, L. D., and Schmidt, R. J. (1992) Analysis of the DNA binding and Transcriptional Activation by the Maize bZIP Protein Opaque-2. Poster presentation, The 34th Annual Maize Genetics Conference, Pacific Grove, California, USA
- Ketudat, M., Parsons, R. L., Aukerman, M. J., Pysh, L. D., and Schmidt, R. J. (1991) Analysis of Opaque-2 Function. Poster presentation, The Third International Society for Plant Molecular Biology, Tucson, Arizona, USA
- Ketudat, M., and Schmidt, R. J. (1991) Analysis of Opaque-2 Function. Presentation, The Third International Society for Plant Molecular Biology, Tucson, Arizona, USA

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย อนันต์ศักดิ์ ลุนจันทา
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Anantasak Loonchanta
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 4001 01244 51 8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยวิจัย
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
e-mail: anantasak@hotmail.com
5. ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2546 วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
พ.ศ. 2548 Master of Science (Chemistry)
Uppsala University, Uppsala, Sweden
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 - Molecular Biology & Genetic Engineering
 - Recombinant Protein Production
 - Bioinformatics
 - Protein Crystallization และ Protein X-ray Chystallography
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -
 - 7.2 ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้
 - Production of Tilapia Transglutaminase
 - Expression and Production of β -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*
 - 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :
 - Expression and Production of β -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*
 - Production of Tilapia Transglutaminase