รหัสโครงการ SUT-102-47-24-22

รายงานการวิจัย

การแยกเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 การทำให้บริสุทธิ์ และการแยกยีนเพื่อการศึกษาคุณสมบัติทางเอ็นไซม์ในการใช้ไคติน

(Isolation, Purification and Gene Isolation of a Chitinase from a Marine Bacterium, *Vibio alginolyticus* strain 283 for Determination of Its Enzymatic Properties in Chitin Utilization)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT-102-47-24-22

รายงานการวิจัย

การแยกเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 การทำให้บริสุทธิ์ และการแยกยีนเพื่อการศึกษาคุณสมบัติทางเอ็นไซม์ในการใช้ไคติน

(Isolation, Purification and Gene Isolation of a Chitinase from a Marine Bacteium, *Vibio alginolytcus* strain 283 for Determination of Its Enzymatic Properties in Chitin Utilization)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางอัจฉรา กอบเดช

นางสาววงษ์เดือน คำจัตุรัส

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2550

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์. ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

This research describes the isolation of genomic DNA of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283. A 3-8 kb DNA library was constructed from the *Sau*3AI partial digests and chitinase expression was detected immunologically using anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies as the specific probe. A DNA fragment of approximately 7 kB, which was cloned into the pBluescript II KS(-) plasmid, was proved to contain an open reading frame of 1,740 nucleotides that encodes a 63-kDa chitinase. The expressed protein reacted strongly with anti-chitinase A antibodies and was able to hydrolyze glycol-chitin substrate. The putative amino acid sequence of *V. alginolyticus* chitinase displayed highest identity with *V. carchariae* chitinase A but lowest identity to *B. circulans* chitinase A1. Chitin binding proteins were further isolated from *V. alginoloyticus* strain 283. Tryptic peptide mass analysis by HPLC-MS identified four proteins that bound specifically to chitin. Submission of mass fingerprinting data for database search identified the 90-kDa, 65-kDa, and 47-kDa proteins as chitinases. On the other hand, the 38-kDa protein was compatible with a sugar-inducible porin. The 90-kDa and 65-kDa proteins, later designated Chi-90 and Chi-65 respectively, were further purified using Sephacryl 200® HR gel filtration chromatography. Kinetic study demonstrated that Chi-65 had 4.5 folds greater catalytic rate (k_{cat}) towards *p*NP-$[GlcNAc]_2$ than Chi-90. Investigation of chitinase activity as a function of pH revealed that both enzymes worked best at pH of 6.5. Product analysis by TLC displayed similar patternes in chitooligosaccharide and chitin hydrolyses, where both enzymes did not degrade chitobiose and hydrolyze G4, yielding G2 as the major product. Three reaction products (G1, G2, and G3) were detected from G6 hydrolysis, giving an indicaition that both enzymes act as endochitinases. The final products obtained from chitin hydrolysis were G2 and G3.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	12
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	24
ข้อเสนอแนะ	25
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	28
ภาคผนวก ข	30
ประวัติผู้วิจัย	31

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ 1

รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์จีโนมที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* 283 บน 0.8% agarose gel electrophoresis..... 12

รูปที่ 3.2 แสดงขนาดและปริมาณของจีโนมที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI..... 12

รูปที่ 3.3 Colony lift ครั้งที่ 2..... 13

รูปที่ 3.4 การแสดงออกของยีนไคติเนสจากโคลน C1-C6 ใน *E. coli* DH 5α..... 14

รูปที่ 3.5 การวิเคราะห์หาไคติเนสแอคติวิตี้ของโคลน C6 ด้วย native PAGE ที่ย้อมด้วย glycol chitin..... 15

รูปที่ 3.6 แสดง open reading frame จาก DNA insert ของโคลน C6 ที่ถอดระหัสให้เอ็นไซม์ไคติเนส..... 16

รูปที่ 3.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไคติเนสของ *V. alginolyticus* 283..... 17

รูปที่ 3.8 การวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกชะออกมาจาก chitin affinity chromatography ด้วย SDS/PAGE..... 18

รูปที่ 3.9 แสดงการวิเคราะห์โปรตีน Chi-90 และ Chi-65 ด้วย SDS/PAGE..... 20

รูปที่ 3.10 การวิเคราะห์ผลิตผลจากปฏิกิริยาการสลาย G4 และ G6 โดยเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 ด้วยเทคนิค TLC..... 22

รูปที่ 3.11 การวิเคราะห์ผลิตผลจากปฏิกิริยาการสลาย colloidal chitin..... 23

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการทำ Sequest search ของ tryptic peptides ของแถบโปรตีน ที่ชะออกมาจาก chitin affinity chromatography แล้ววิเคราะห์หา m/z ด้วย HPLC ESI/MS..... 19

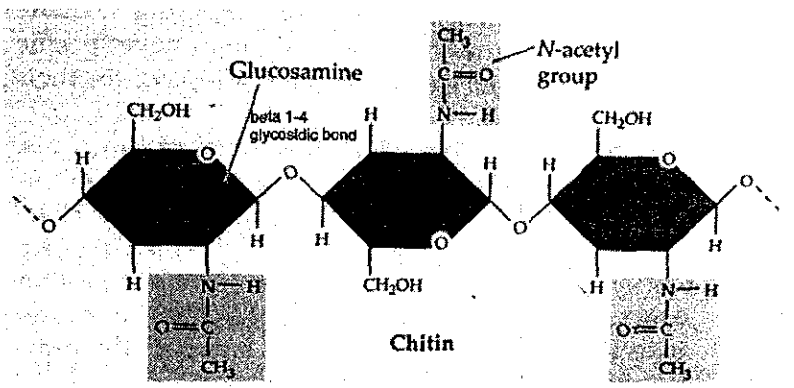
ตารางที่ 3.2 การทำบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65..... 21

ตารางที่ 3.3 การศึกษาทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 โดยใช้ pNP[GlcNAc]$_2$ เป็นสับสเตรท..... 21

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อยๆ ที่เรียกว่า *N*-acetylglucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกที่ตำแหน่ง β1→4 ดังรูปที่ 1.1



ปที่ 1.1 โครงสร้างของโพลีเมอร์ของไคติน (แหล่งที่มา: academic.brooklyn.cuny.edu/.../page/chitin.html)

คตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่างๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และงค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่องรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ต่อปี [1] งนั้น จึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสียและอื่นๆ เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายจ้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นการของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตะแปรรูปอาหาร เช่นอาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดมูหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการมนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอ็นไซม์เป็นที่ได้รับามสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับการรมวิธีทางเคมีทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพาตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอ็นไซม์สามตัวด้วยขั้นตอนหลักๆ ไคตินโพลีเมอร์ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เอ็นโดไคติเนสให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคติน โอลิโกเมอร์ งจากนั้นโอลิโกเมอร์จะถูกย่อยต่อไปให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ด้วยเอ็นไซม์เอ็กโซไคติเนส หรือไคโตไบ

เอส (chitobiase) ขั้นตอนสุดท้ายคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอ็นไซม์เอ็นอะซิทิลกลูโคลซะมินิเดส (N-acetyl glucosaminidase) [2] เอ็นไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่างๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไป เช่น ที่ส่วนต่างๆ ของพืช และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล และสัตว์เคี้ยวเอื้อง หน้าที่ของเอ็นไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา [3,4,5] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอ็นไซม์นี้มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่ [6,7] มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลงและปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น [8,9,10] นอกจากนี้เอ็นไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา [11] ส่วนในพืชเอ็นไซม์นี้มีส่วนในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช [12,13] และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช [14]

ได้มีการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี Vibrionaceae เป็นแหล่งเอ็นไซม์ไคติเนสที่สำคัญ ในธรรมชาติแบคทีเรียนี้จะผลิตและหลั่งเอ็นไซม์ออกจากเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่สะสมหรือเป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น สาหร่ายสีเขียว ไดอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์ [15,16,17] ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแหล่งเอ็นไซม์ที่สำคัญต่อขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioconversion process) ได้มีการวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาทางโมเลกุลเพื่อศึกษาองค์ประกอบของระบบยีนไคติเนสในแบคทีเรีย [18,19] แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง สามมิติของเอ็นไซม์นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia marcescens* [20] เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานของเอ็นไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่น การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา [21] การเกษตร เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย เป็นต้น ให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่างๆ [22] และทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลิตผลจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการเกษตร [23,24]

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ทำการแยกยีนและการโคลนยีนไคติเนสจากเชื้อ *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283
2. ศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* ความสามารถในการย่อยไคติน
3. แยกเอ็นไซม์ไคติเนสไอโซไซม์ต่างๆ จากเชื้อ *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283
4. คัดเลือกไอโซไซม์ที่มีความสามารถในการใช้ไคตินสูงที่สุดและการทำให้บริสุทธิ์
5. ศึกษาสมบัติในการย่อยสลายไคตินและสับเสตรทอื่นๆ ของไอโซไซม์ดังข้อ 2 และศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure)

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียในทะเลในสปีชีส์ *Vibrios* ขอบเขตงานวิจัย เริ่มต้นจากการแยกยีนไคติเนสจากห้องสมุดจีโนม (genomic library) ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolytcus* โดยใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิยาหรือเทคนิคทาง PCR การโคลนยีนไคติเนสและการศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อ *E. coli* การแยกไอโซไซม์ต่างๆ ที่ผลิตโดยเชื้อ *Vibrio alginolyticus* 283 ขั้นตอนที่สองคือการคัดเลือกไอโซไซม์ที่มีความสามารถในการใช้ไคตินที่เตรียมจากเปลือกกุ้งและเปลือกปูสูงที่สุดเนื่องจากมีเป้าหมายในการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ในการย่อยไคตินจากแหล่งดังกล่าวที่ผลิตเป็นกากของเสียที่ปล่อยทิ้งโดยรางงานแปรรูปอาหารทะเลตามแถบชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกของอ่าวไทย ขั้นตอนต่อไปคือการทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตรกราฟฟี เช่น การใช้ chitin affinity chromatography ตามด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการแยกด้วย gel filtration (Sephacryl® S200-HR) และโครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน (DEAE-ion exchanger) เป็นต้น เมื่อได้เอ็นไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงแล้วจะทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอ็นไซม์ เช่น การศึกษาอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม การศึกษาอุณหภูมิและpH ในการรักษาสภาพของเอ็นไซม์การศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ การหาค่า pI และการศึกษาคุณสมบิทางจลนศาสตร์ทางเอ็นไซม์ enzyme kinetics) เป็นต้น ขั้นตอนต่อไปคือขั้นตอนสุดท้ายคือการศึกษาเปรียบเทียบทางด้านโครงสร้างและความสารถในการใช้สับสเตรทของเอ็นไซม์ไคติเนส เอ กับไอโซไซม์อื่นๆ

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามรถของเอ็นไซม์ไคติเนสไอโซไซม์ต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 ในไคตินชนิดต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกเอ็นไซม์ไอโซไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสลายไคติน
2. การแยกยีนไคติเนสมีเป้าหมายในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสให้ได้ปริมาณมากๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์แปรสภาพไคตินที่ผลิตเป็นกากของเสียตามโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ต่อไป
3. การศึกษาระบบของยีนไคติเนสในเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio* ไคติเนสทำให้เข้าใจโครงสร้างของยีนและโดยอาศัยเทคนิคทางด้าน protein engineering ในการออกแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อสภาวะที่ใช้การย่อยไคตินโดยการหมัก เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นไซม์ทำให้ทนต่อความร้อนในถังหมักหรือมีความจำเพาะต่อการใช้ไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งเปลือกปูสูง
4. มีแนวทางในการวิจัยในอนาคตที่จะมุ่งไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอ็นไซม์นี้ให้เหมาะสม

เพื่อนำเอ็นไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแพทย์ เช่น การทดสอบในการ antigeneicity ในสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนป้องกันเชื้อราทั้งในคนและสัตว์ต่อไป

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานในมหาวิทยาลัยหรือสถาบันวิจัยที่ทำงานเกี่ยวกับการแพทย์หรือสาธารณสุข เกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อต่างๆ
2. หน่วยงานภาคที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเกษตร เช่น กรมพัฒนาส่งเสริมการเกษตร
3. หน่วยงานภาคอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดมลภาวะที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม
4. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเนื่องจากงานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการสอนการวิจัยและการผลิตบัณฑิตศึกษาในระดับปริญญาโทและเอกของสาขาชีวเคมี สำนักวิทยาสาสตร์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การสกัดจีโนมของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

เชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง marine medium, pH 7.6 (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 10 ml โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ ในตู้อบทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 100 ml และทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะเดิมจนเชื้อเจริญเติบโตถึง stationary phase ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดจีโนม[25] ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ละลายเซลล์ด้วย 9.5 ml Tris-EDTA (TE) buffer ที่มี 10%(w/v) SDS และ 0.1 mg/ml proteinase K เป็นองค์ประกอบ เขย่าเบา ๆ แล้วบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติม 1.8 ml 5M NaCl เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 1.5 ml สารละลาย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)/NaCl (ภาคผนวก ก) เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 60°ซ เป็นเวลา 20 นาที
4. เติม chloroform/isoamyl alcolhol (24:1 โดยปริมาตร) ในปริมาตรที่เท่ากับสายละลายตัวอย่าง กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ แล้วปั่นแยกชั้น ดีเอ็นเอ ออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที
5. ค่อย ๆ ดูดสารละลายชั้นบนที่มีจีโนมของแบคทีเรียอยู่ลงในหลอดทดลองใหม่ โดยใช้ micropipette ขนาด 1.0 ml ที่ตัดปลายออก
6. เติม 0.6 volumes isopropranol ลงในสายละลายดีเอ็นเอ กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็นสีขาวเป็นก้อนพันกันอยู่
7. ค่อย ๆ ใช้ Pasteur pipette ที่ปลายงอเป็นตะขอปิด เขี่ยตะกอนดีเอ็นเอ ขึ้นมาใส่หลอดทดลองใหม่ที่มี 1 ml 70% (v/v) ethanol
8. ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายเอธานอล ออก คว่ำหลอดทดลองพอให้ดีเอ็นเอ แห้งแบบหมาด ๆ แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 4 ml buffer ทิ้งสารละลายดีเอ็นเอ ค้างคืนไว้ที่ 4°ซ
9. วัดค่า A_{260}/A_{280} เพื่อหาความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้

2.2. การแยกยีนไคติเนสจากจีโนมของแบคทีเรียของเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283

- การเตรียม *Sau*3AI partial digests จาก genomic DNA

ทำการย่อย genomic DNA ที่เตรียมได้ข้างต้นด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3AI (Promega, USA) โดยใช้ปฏิกิริยา 450 µl ที่ประกอบด้วย

10 mg genomic DNA	150 µl
*Sau*3AI buffer	45 µl
BSA	50 µl
dH_2O	205 µl
Total volume	**450 µl**

ทำการย่อยดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาเดียวกันซ้ำกัน 4 ครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณ partial digests มากพอ ทำการบ่มปฏิกิริยาในแต่ละหลอดที่ 37°ซ เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นเติม 10 µl 0.5 M EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยา และทำการเตรียมดีเอ็นเอ ที่ถูกย่อยดังนี้

1. ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย absolute ethanol ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 400 µl dH_2O
2. แยกดีเอ็นเอ โดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีส โดยใช้ 0.8 % agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 45 นาที
3. ย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วตัดเจลช่วงที่มีดีเอ็นเอ ขนาด 3-8 kb
4. สกัดดีเอ็นเอ จากเจลโดยใช้ DNA purification kit (Qiagen, Germany)
5. ชะดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย 2 x 60 ml dH_2O
6. ทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ว่าถูกต้องหรือไม่ โดย run 2 µl ของดีเอ็นเอที่สกัดได้บน 1% agarose gel เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb-ladder marker

- การเตรียม pBluescript II KS(-) สำหรับ ligation

ทำการเตรียมพลาสมิด pBluescript II KS(-) โดยวิธี Plasmid miniprep kit (Qiagen, Germany) และทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดังนี้

ปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย

pBluescript plasmid	20 µl
10 x *Bam*HI buffer	5 µl
*Bam*HI	2.5 µl
dH_2O	22.5 µl

บ่มปฏิกิริยาที่ 37°ซ เป็นเวลา 90 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 µl 0.5 M EDTA และให้ความร้อนที่ 70°ซ นาน 10 นาที แล้วนำ 1µl ของพลาสมิดที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ต่อจากนั้นทำการเทียบหาปริมาณ ดีเอ็นเอระหว่าง *Sau*3AI partial digest กับปริมาณพลาสมิด

- การทำ ligation

ทำการเชื่อมพลาสมิด pBluescript II KS(-) ที่ย่อยด้วย *Bam*HI กับ *Sau*3AI partial digests โดยใช้อัตราส่วนของชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดคือ 5:1และ 10:1 ดังปฏิกิริยาข้างล่าง

ปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย

องค์ประกอบ	อัตราส่วนของ *Sau*3AI partial digests: plasmid		
	5:1 (µl)	10:1 (µl)	Control (µl)
*Bam*HI digested pBluescript	2	2	2
*Sau*3AI partial digests	5	10	-
10x ligation buffer	2.5	2.5	2.5
*Bam*HI	1	1	1
DNA ligase	1	1	1
dH_2O	13.5	8.5	18.5

บ่มปฏิกิริยาค้างคืนที่ 16°ซ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 10 µl dH_2O แล้วนำ ดีเอ็นเอ เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี electroporation หลังจากนั้นทำการ spread เซลล์ปริมาณ 50 µl ลงใน LB agar plate ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 40 µg/ml X-Gal บ่มเซลล์ที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้น

2.3. การตรวจหายีนไคติเนสโดยวิธี expression screening

ทำการตรวจหายีนไคติเนสจาก *Sau3A*I partial digests ที่สร้างขึ้นโดยการทำ colony lift ตามวิธีของ Sedgwick *et. al.*[26] กล่าวคือ ทำการ lift โคโลนีทั้งหมดบน agar plate ด้วย Hyperbond C nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Sweden) ที่ตัดเป็นวงกลมเท่ากับขนาดของ Pestri dish ทำเครื่องหมายบนเมมเบรนเพื่อแสดงตำแหน่งของโคโลนีที่ยกขึ้นมา นำเมมเบรนไปวางบนกระดาษกรองที่ทำให้ชุ่มด้วย 5% (w/v) SDS เพื่อสลายโคโลนีที่อยู่บนเมมเบรน ทำการ fix เซลล์ที่แตกด้วยการอบที่อุณหภูมิ 85°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเมมเบรนมาแช่ย่าในสารละลายที่มี 5% (w/v) skimmed milk ที่เตรียมใน PBS-T buffer (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 30 นาทีและทำการตรวจหาการโปรตีนไคติเนสที่สร้างขึ้นทางอิมมูโนวิทยาด้วยวิธี ECL (Amersham Bioscience, Sweden) โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies [27] ที่

มีอยู่ในสัดส่วน 1:2,500 และใช้ anti-IgG polyclonal antibodies ที่ conjugate กับ horse raddish peroxidase ในสัดส่วน 1:5,000 เป็น secondary antibodies และใช้ chemiluminescence ECL เป็น
สับสเตรท ส่วน agar plate ตั้งต้นนำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงเพื่อให้โคโลนีโตเหมือนเดิมและเก็บไว้อ้างอิงหาตำแหน่งของโคโลนีที่ให้ผลบวก

2.4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนส

สุ่มเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวก 6 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 ml ที่มี 100 µg/ml ampicillin และ 0.5 mM IPTG หรือ 2.5%(w/v) colloidal chitin (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ 37°ซ หลังจากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์และสลายเซลล์ด้วยการเติม 100 µl 3xSDS loading buffer ทำการปั่นแยกส่วนของเซลล์ที่ไม่ละลายออกไป นำส่วนใสที่ได้ของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 15 µl มาแยกด้วยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 12% acrylamide gel โดยทำการแยกโปรตีนในเจล 2 แผ่น เจลแผ่นที่ 1 นำไปย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue ส่วนเจลแผ่นที่2 นำไปทำการตรวจหาโปรตีนโดยวิธี immunoblotting โดยตรวจหาเอ็นไซม์ไคติเนสด้วย anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies ตามการทดลองที่ได้กล่าวมาแล้ว

2.5. การวิเคราะห์ DNA insert และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสด้วยวิธี DNA sequencing

ทำการสกัดริคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากเซลล์ที่สร้างเอ็นไซม์ไคติเนสโดยใช้ Plasmid Mininprep kit (Qiagen, Germany) แล้วทำการพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เช่น *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, XbaI, *Sac*I, *Nco*I, *Xho*I, *Not*I, *Sau*3AI และ *Pst*I และแยก ดีเอ็นเอ บน 1% agarose gel โดยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีส สังเกตขนาดและชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและทำการตรวจสอบยีนไคติเนสโดยเทคนิค PCR โดยใช้ forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการ amplify ยีนไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี automatic sequencing (BioServiceUnit, Thailand) โดยใช้ universal primers คือ M13 reverse primer และ M13 forward primer เป็น primer ตั้งต้น จากนั้นทำการออกแบบ primers แล้วทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสเอทั้งสองสายดีเอ็นเอ

2.6. การเตรียมโปรตีนโดยวิธี chitin affinity chromatography

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ*เชื้อ V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 ลงในอาหารเหลว marine medium สูตร 2216E (ภาคผนวก ข) ที่เติม 3.0% (w/v) colloidal chitin ปริมาตร 10 ml ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 3 x 500 ml ที่มี 2.5 %(w/v) colloidal chitin ทำการเขย่าต่อที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเพื่อกำจัดเซลล์และไคตินออกไปที่ความเร็ว 2795 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4° ซ ส่วนส่วนใสที่ประกอบด้วยโปรตีนต่าง ๆ ที่แบคทีเรีย

หลั่งออกมานอกเซลล์นำเรียกว่าส่วน 'GM' นำไปเติมด้วย 20 g ของ colloidal chitin แล้วเขย่าเป็นเวลา 60 นาทีที่อุณหภูมิ 4°ซ หลังจากนั้นปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็ว 2795 x g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °ซ ทำการทดลองในขั้นตอนการจับด้วยไคตินซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ทำการรวมตะกอนทั้งสองครั้งแล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วย 100 mM sodium carbonate buffer, pH 8.5 จนวัดค่า A_{280} ได้ต่ำกว่า 0.1 หลังจากนั้นล้างตะกอนอีกครั้งด้วย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 จนค่า A_{280} เข้าใกล้ 0 ขั้นตอนต่อไปคือการชะเอาโปรตีนที่จับไคตินให้หลุดออกมาด้วยการเติม Guanidine HCl ความเข้มข้น 2M ปริมาตร 50 ml ทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีที่ 4 °ซ ทำการปั่นที่ความเร็ว 2795 x g เป็นเวลา 3 นาที ที่ 4°ซ แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ไปทำ dialysis ข้ามคืนที่ 4°ซ เพื่อกำจัด guanidine HCl โดยใช้บัฟเฟอร์คือ 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 เรียกส่วนนี้ว่า 'CA'

2.7. การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยการทำ peptide mass fingerprinting

นำส่วน 'CA' ที่เตรียมจากขั้นตอนการทำ chitin affinity chromatography นำไปแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS/PAGE แล้วย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie blue หลังจากนั้นตัดแถบโปรตีนที่มีขนาด 95 65 45 และ 30 กิโลดาลตัน แล้วทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริบซิน (Bio-Active Co., Ltd, Bangkok, Thailand) ตามวิธีของ Shevchenko et al. [28] ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเพปไทด์ที่เตรียมได้มาทำบริสุทธิ์โดยการฉีดเข้าคอลัมน์ C18 ที่ต่ออยู่กับระบบ Agilent 1100 HPLC ทำการแยกเพปไทด์ต่าง ๆ ออกจากกันโดยการชะด้วย 0–40 % linear gradient ของ acetronitrile ที่มี 0.1% acetic acid อยู่แล้ววัดหามวลของของเพปไทด์ที่แยกได้ด้วยเครื่อง Thermo Finnigan LCQ Deca electrospary ionization mass spectrometer (ESI/MS) โดยเลือกช่วง *m/z* ในการวิเคราะห์ที่ 500-2,000 หลังจากนั้นทำ peptide mass fingerprinting โดยนำค่า m/z ของเพบไทด์ทั้งหมดไปทำ ''Sequest search'' (http://fields.-scripps.edu/sequest/index.html) เพื่อตรวจหาความเหมือนของเพปไทด์เทียบกับเพปไทด์ของโปรตีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ใน protein database

2.8. การทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์ไคติเนส Chi-90 และ Chi-65

นำส่วน dialyzed CA มาตกตะกอนข้ามคืนด้วยเกลืออัมโมเนียซัลเฟตที่ 0-70% อิ่มตัว หลังจากนั้นทำการปั่นตกตะกอนที่ 16,099 × g เป็นเวลา 60 min ที่อุณหภูมิ 4° ซ ต่อจากนั้นละลายตะกอนด้วน 2.0 ml 20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0 ที่มี 150 mM NaCl นำส่วนที่ละลายไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephacryl S200 HR (1.5 cm × 120 cm) โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ทำการเก็บ fraction แล้ววัดหาค่า A_{280} นำส่วนที่ให้ค่าดูดกลืนแสง A280 มาวิเคราะห์ด้วย SDS/PAGE และวัดหาค่าแอคติวิตี้ของไคติเนส ทำการรวม fraction ที่ให้แถบโปรตีนที่ 90 กิโลดาลตัน แยกต่างหากจาก fraction ที่ให้แถบโปรตีนที่ 65 กิโลดาลตันเรียก pooled fraction ทั้งสองส่วนว่า 'Chi-90 และ Chi-65' ตามลำดับ นำโปรตีนทั้งสองส่วนมาวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีของ Bradford [29] โดยใช้กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ปริมาณ 0–25 μg

2.9. การตรวจหาลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายด้านอะมิโน

นำโปรตีนตัวอย่างสองชนิดคือ P1 และ P2 ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบ Sephacryl S200 HR filtration มาแยกด้วย 12% SDS-PAGE ที่ได้ทำการ pre-run ข้ามคืนไว้แล้ว หลังจากนั้นย้ายแถบโปรตีนที่ฝังอยู่บนแผ่นอะคลิลาไมด์ลงบนแผ่นเมมเบรนชนิด BioTrace™ Polyvinylidene Fluoride (PVDF) (Pall Corporation, Pensacola, FL, USA) โดยเครื่อง Trans-Blot® Semi-Dry Cell (Bio-Rad Laboratories Ltd., Bangkok, Thailand) โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ขนาด 20 โวลท์ เป็นเวลา 30 – 45 นาที ต่อจากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยการนำมาแช่ย่าในน้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้อมแถบโปรตีนบนเมมเบรนด้วย 0.1% Coomassie blue ตามด้วยการล้างด้วย methanol: glacial acetic acid: water (50:10:40, v/v) จนแผ่นเมมเบรนไม่มีสีติดอยู่ ทำการตัดแถบโปรตีนขนาด 90 และ 65 กิโลดาลตัน ด้วยมีดโกนสะอาดแล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายด้านอะมิโนโดยการทำ Edmand degradation โดยใช้เครื่อง automatic amino acid sequencer ของหน่วยบริการ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา

2.10. การตรวจหาแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ไคติเนส

ทำการตรวจหาแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ไคติเนสใน 96-well microtiter plate โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 100 µl ที่ประกอบด้วย โปรตีนตัวอย่าง (10 µl) สับเสตรท คือ 1 mM *p*NP-$(GlcNAc)_2$ (25 µl) และ 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 (65 µl) ทำการบ่มปฏิกิริยาด้วยการเขย่าด้วยความเร็วรอบคงที่ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 50 µl 1.0 M Na_2CO_3 วัดหาผลิตผล *p*-nitrophenol (*p*NP) ที่เกิดขึ้นด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (A_{405}) โดยใช้เครื่อง microtiter plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ทำการคำนวณหาปริมาณของ *p*NP จากกราฟมาตรฐานของ *p*NP ที่สร้างขึ้นในช่วง 0 ถึง 30 nmol

2.11. การวัดปริมาณโปรตีนและวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Western blot analysis

ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าด้วย 12% SDS/PAGE [30] หลังจากนั้นถ่านโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่องมือ Trans-Blot® Semi-Dry Cell (Bio-Rad Laboratories Ltd., Bangkok, Thailand) หลังจากนั้นทำการตรวจทางอิมมูโนวิทยาตามวิธีของ ECL โดยใช้ระบบ enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham Pharmacia Biotech Asia Pacific Ltd., Thailand) และตรวจจับด้วยแอนติบอดีอันดับที่หนึ่งคือ anti-chitinase A polyclonal antibody ที่เตรียมจากโปรตีนไคติเนส เอ ของเชื้อ *V. carchariae* [27] ด้วยสัดส่วน 1:2500 dilution ตามด้วยการตรวจจับด้วยแอนติบอดีอันดับที่สอง คือ anti-rabbit IgG ที่ยึดกับเอ็นไซม์ horse radish peroxidase ในสัดส่วน 1:5000

2.12. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

ทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 โดยวิธี colorimetric assay โดยในปฏิกิริยา 100 µl ประกอบด้วย 0–500 µM *p*NP-$(GlcNAc)_2$ ในสารละลาย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 และ dH_2O โดยทำการ pre-incubate ของเหลวใน microtiterplate ที่ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมเอ็นไซม์ปริมาณ 400 ng และบ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 50 µl 1 M Na_2CO_3 ทำการวัดหาปริมาณ *p*NP ที่เกิดขึ้นโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ A_{405} และสร้างกราฟมาตรฐานของ *p*NP ในช่วง 0–30 nmol ต่อจากนั้นทำการคำนวณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ เช่นค่า K_m ค่า V_{max} ค่า k_{cat} จากการทดลองซ้ำสามครั้ง โดยใช้ฟังก์ชัน nonlinear regression จากโปรแกรม GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

2.13. การตรวจหาผลของ pH ต่อการทำงานของ Chi-90 และ Chi-65

ทำการศึกษาผลของ pH ต่อความสามารถในการสลาย *p*NP-$[GlcNAc]_2$ ของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 ในช่วงของ pH ตั้งแต่ 3.0 ถึง 10.0 โดยทำการทดลองเหมือนกับการหาแอคติวิตี้ของไคติเนสดังอธิบายในการทดลองข้อที่ 2.10. และทำการรักษาสภาพบัฟเฟอร์ของ pH ช่วงต่าง ๆ โดยใช้บัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังนี้

- 100 mM potassium phosphate buffer สำหรับ pH 3.0 และ pH 4.0
- 100 mM sodium acetate buffer สำหรับ pH 4.5 ถึง pH 5.5
- 100 mM MES buffer สำหรับ pH 6.0
- 100 mM sodium phosphate buffer สำหรับ pH 6.5 และ pH 7.0
- 100 mM Tris/HCl สำหรับ pH 8.0 และ pH 9.0
- 100 mM CAPS buffer สำหรับ pH 10.0

2.14. การศึกษาการย่อยสับสเตรทโดยวิธี thin layer chromatography (TLC)

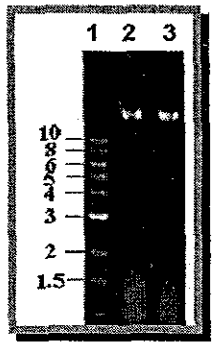
ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (G2-G6) ของChi-90 และ Chi-65 ในปริมาตร 20 µl โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ที่มี 2.5 mM สับสเตรท และ 200 ng เอ็นไซม์บริสุทธิ์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37°ซ เป็นเวลา 0, 2.5, 5, 10, 30, 60 นาที และข้ามคืน หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 5 µl นำไปวิเคราะห์หาผลิตผลที่เกิดขึ้นด้วยวิธี thin layer chromatography โดยใช้แผ่น silica TLC plate ขนาด5.0 ซม × 6.0 ซม เป็น stationary phase และมี mobile phase ที่ประกอบด้วย *n*-butanol:methanol: 30% ammonia solution:H_2O (10:8:4:2) (v/v) หลังจากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลาย aniline–diphenylamine reagent แล้วอบที่ 120°ซ เป็นเวลา 5–10 นาที [31]

บทที่ 3

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

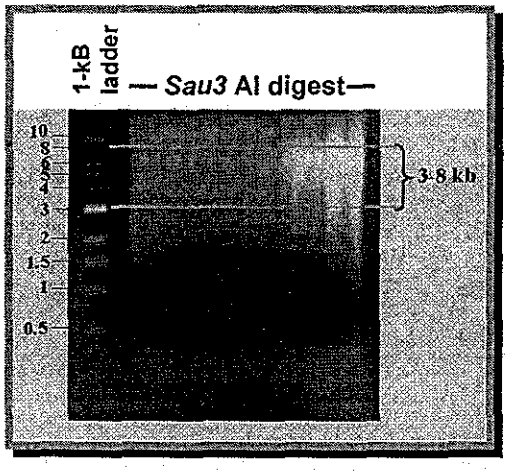
3.1. เตรียมจีโนมของแบคทีเรีย *V. alginolyticus 283* และการตรวจหายีนไคติเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอ

ทำการเตรียมจีโนมของเชื้อ *V. alginolyticus* 283 โดยวิธีของ Ausubel [25] และได้ทำการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมที่เตรียมได้โดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 0.8% agarose gel พบว่าจีโนมมีคุณภาพที่ดี (รูปที่ 3.1) โดยสังเกตุจากแถบดมชัดของแถบดีเอ็นเอขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส ที่ไม่มีการแตกหักเป็นเส้นเล็ก ๆ ปริมาณของดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ 1.4 mg/100 ml ของเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์จีโนมที่สกัดจากเชื้อ *V. alginolyticus* 283 บน 0.8% agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1 คือ1-kB ladder DNA marker และช่องที่ 2-3 คือ genomic DNA

จากจีโนมที่เตรียมได้นำมาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัด *Sau*3AI เอ็นไซม์นี้มีความสามารถในการตัดแบบจำเพาะที่มีบริเวณจดจำที่มีลำดับของนิวคลิโอไทด์ 4 ตัว คือ /GATC ทำให้ตัดชิ้นจีโนมได้ถี่และมีขนาดของ DNA ที่ถูกย่อยจากชิ้นเล็กมาก ๆ ไปถึงชิ้นใหญ่มาก ๆ (รูปที่ 3.2)

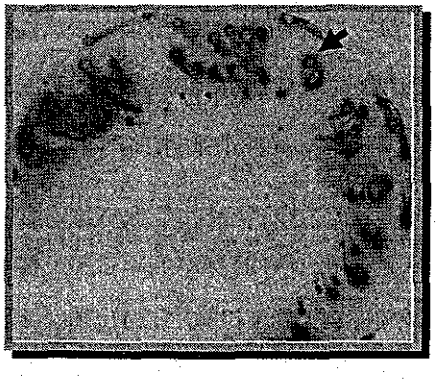


รูปที่ 3.2 แสดงขนาดและปริมาณของจีโนมที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI (30 mU/µl) เป็นเวลา 120 นาที ที่ 37°ซ

จากรูปที่ 3.1 เมื่อให้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ 30 mU/µl และเวลาในย่อย 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าขนาดของ DNA ที่ถูกย่อยมีปริมาณมากอยู่ในช่วง 3-8 kb ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ จึงได้ทำการตัดเจลภายใต้แสง UV โดยเลือกช่วงดีเอ็นเอ ขนาด 3-8 kb แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Qiagen DNA Extraction kit ตามด้วยการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้อีกครั้งหนึ่งโดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีส พบว่าได้ดีเอ็นเอ ตามขนาดที่ต้องการพร้อมที่จะนำไปสร้างเป็นห้องสมุดดีเอ็นเอของ *V. alginolyticus* 283

Partial digests ของจีโนมที่เตรียมด้วยเอ็นไซม์ Sau3AI สามารถที่จะนำมาเชื่อมกับพลาสมิด pBluescript II KS(-) ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เนื่องจากเอ็นไซม์ทั้งสองมีตำแหน่งตัดที่ overlap กัน (*Sau3*AI คือ /**GATC** และ*Bam*HI คือ /G**GATC**C) เมื่อทำปฏิกิริยาเชื่อม *Sau*3AI partial digests กับพลาสมิด pBluescript โดยใช้อัตราส่วนของชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดคือ 5:1 และ 10:1 ดังการทดลองที่ 2.2.3 แล้ว transform ริคอมบิแนนพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5α จากปริมาตรของเซลล์ทั้งหมด 50 µl ได้ใช้ 10 µl นับจำนวนโคโลนีบน LB/amp agar plate และทำ primary screening เพื่อตรวจหา DNA insert พบว่ามีโคโลนีทั้งหมด 103 โคโลนีบน plate ที่ใช้สัดส่วนของดีเอ็นเอกับพลาสมิดเป็น 5:1 และ 11 โคโลนีบน plate ที่ใช้สัดส่วนของ DNA กับพลาสมิดเป็น 10:1 ส่วนใน control plate ไม่พบว่ามีโคโลนีขึ้นเลย

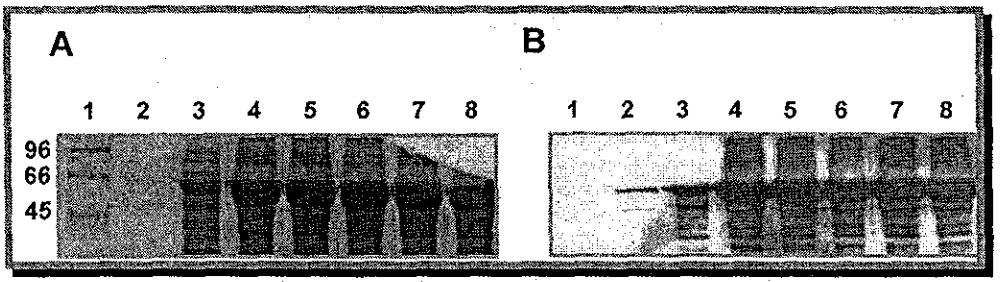
จากโคโลนีที่ขึ้นบน LB/amp agar plate ได้ทำ colony lift (ดูการทดลองที่ 2.3) ตามด้วย immunoblotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies พบว่ามี 1 โคโลนีใน plate ที่มีอัตราส่วนของ DNA กับพลาสมิดเป็น 10:1 ที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี จึงทำการเขี่ยโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงใน 10 ml อาหารเหลว LB/amp และทำการ spread เชื้อลงบน LB/amp agar plate ที่มี 0.5 mM IPTG ทำการบ่มเชื้อที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วทำ colony lift ครั้งที่ 2 โดยใช้ anti-chitinase A antibodies เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่ง ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 Colony lift ครั้งที่ 2 ลูกศรชี้แสดงตัวอย่างโคโลนีที่ให้ผลบวกกับ anti-chitinase A antibodies

จากการทดลองพบว่ามีจำนวนโคโลนีจำนวนมากสามารถผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสได้เนื่องจากให้ผลบวก anti-chitinase polyclonal antibodies ซึ่งแสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกนำเข้าไปในพลาสมิด pBluscript (pBS-chi$_{(V283)}$) มี

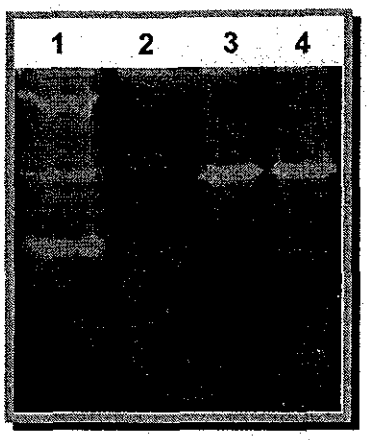
ยีนไคติเนสที่สามารถแสดงออกและสร้างแอนติเจนที่จับกับ anti-chitinase antibodies ได้คือโปรตีนไคติเนส เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน 6 โคลนคือ C1-C6 โดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/amp ที่มี 0.5 mM IPTG ทำการบ่มเชื้อที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 3 x SDS loading buffer ไปสลายเซลล์หลังจากนั้นปั่นกำจัดส่วนที่เป็นเศษเซลล์ทิ้งไป นำส่วนใส 15 µl มาวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE โดย เพื่อทำการศึกษาการผลิตโปรตีนไคติเนสในหลอดทดลองที่วิเคราะห์จาก crude protein โดยการย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue (รูปที่ 3.4A) และการทำ immunoblotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A antibodies (รูปที่ 3.4B) พบว่าโคลนทั้ง 6 สามารถผลิตโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีโดยขนาดของริคอมบิแนนท์ที่สร้างขึ้นคือ ประมาณ 63 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของเอ็นไซม์ไคติเนสเอ ที่โคลนจากเชื้อ *V. carchariae* [32]



รูปที่ 3.4 การแสดงออกของยีนไคติเนสจากโคลน C1-C6 ใน *E. coli* DH 5α
รูป A แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วย 12% SDS/PAGE
รูป B แสดง immunoblotting โดยใช้ aniti-*V. carchariae* chitinase A เป็นตัวจับ
ช่องที่ 1 คือ low MW protein marker; 2 คือไคติเนสบริสุทธิ์ (1 µg) ที่สกัดจาก *V. carchariae*; 3-8 คือโคโลนี C1-C6

จากโคลนทั้ง 6 ที่สามารถผลิตโปรตีนไคได้เลือกโคลนที่ 6 มาทำการสกัดพลาสมิดและทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ (ดูการวิธีการทดลองที่ 2 .5) ผลการย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI และ *Sac*Iทำให้ทราบว่า DNA insert มีขนาดประมาณ 10 kb และดีเอ็นเอนี้ถูกตัดให้ได้ขนาดย่อยต่างๆ เมื่อใช้เอ็นไซม์ตัวอื่น และพบว่าเอ็นไซม์ *Kpn*I สามารถตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงเป็น 7 kb จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอขนาด 7 kb ดังกล่าวและทำให้บริสุทธิ์ตามด้วยการ re-ligate ตัวเองและนำไป religated plasmid ไป transform เข้า *E. coli* DH5α และบ่มเซลล์ 16 ชั่วโมงบน LB/amp agar plateพบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นแสดงว่าดีเอ็นเอขนาด 10 kb ที่ตัดด้วย *Kpn*I ประกอบด้วยพลาสมิด pBluescript (3 kb) และชิ้นดีเอ็นของแบคทีเรียอีก 7 kb ขั้นตอนต่อมาทำทดสอบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสที่แสดงออกได้หรือไม่ จึงได้ทำการเตรียมเซลล์ดังการทดลองที่ 2.4 โดยการเลี้ยงเซลล์ในปริมาตร 10 ml ในอาหารเหลวแล้วสลายเซลล์ด้วย 3x SDS loading buffer ทำการแยก crude protein ด้วยวิธี SDS-PAGE และทำ immunoblotting พบว่าโคลนดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนไคติเนสที่มีขนาด 63 kDa เมื่อนำโปรตีนที่ได้ไป

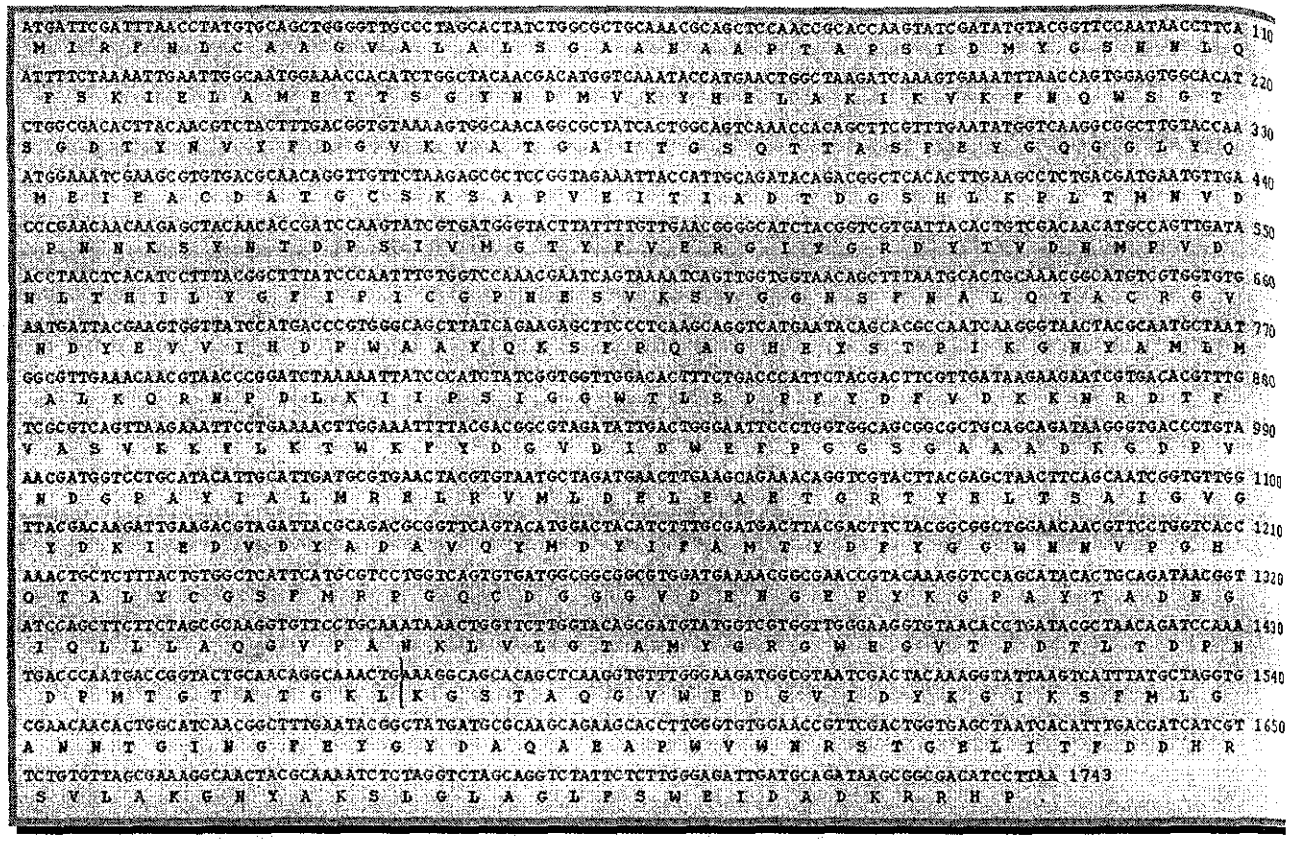
ทำการวิเคราะห์หาไคติเนสแอคติวิตี้บนแผ่นเจล (gel activity assay) โดยใช้ glycol-chitin เป็นสับสเตรทพบแถบเรืองแสงที่แสดงถึงเอ็นไซม์ไคตเนิสของโคลนที่ย่อยด้วย *Kpn*I ดังแสดงในรูปที่ 3.5 การทดลองแสดงให้เห็นว่าโคลนที่ย่อยด้วย *Kpn* I มียีนไคติเนสที่ทำงานได้



รูปที่ 3.5 การวิเคราะห์หาไคติเนสแอคติวิตี้ของโคลน C6 ด้วย native PAGE ที่ย้อมด้วย glycol chitin ช่องที่ 1 แสดงไคติเนสแอคติวิตี้ของ *V. carchariae* chitinase A; 2 คือ crude extract ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pBluscript KS II (-) แต่ไม่มี DNA insert; 4-5 คือ crude extract ที่เตรียมจาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pBS-$Chi_{(V283)}$ ที่ตัดด้วย *Kpn* I แล้วทำ re-legation

3.2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

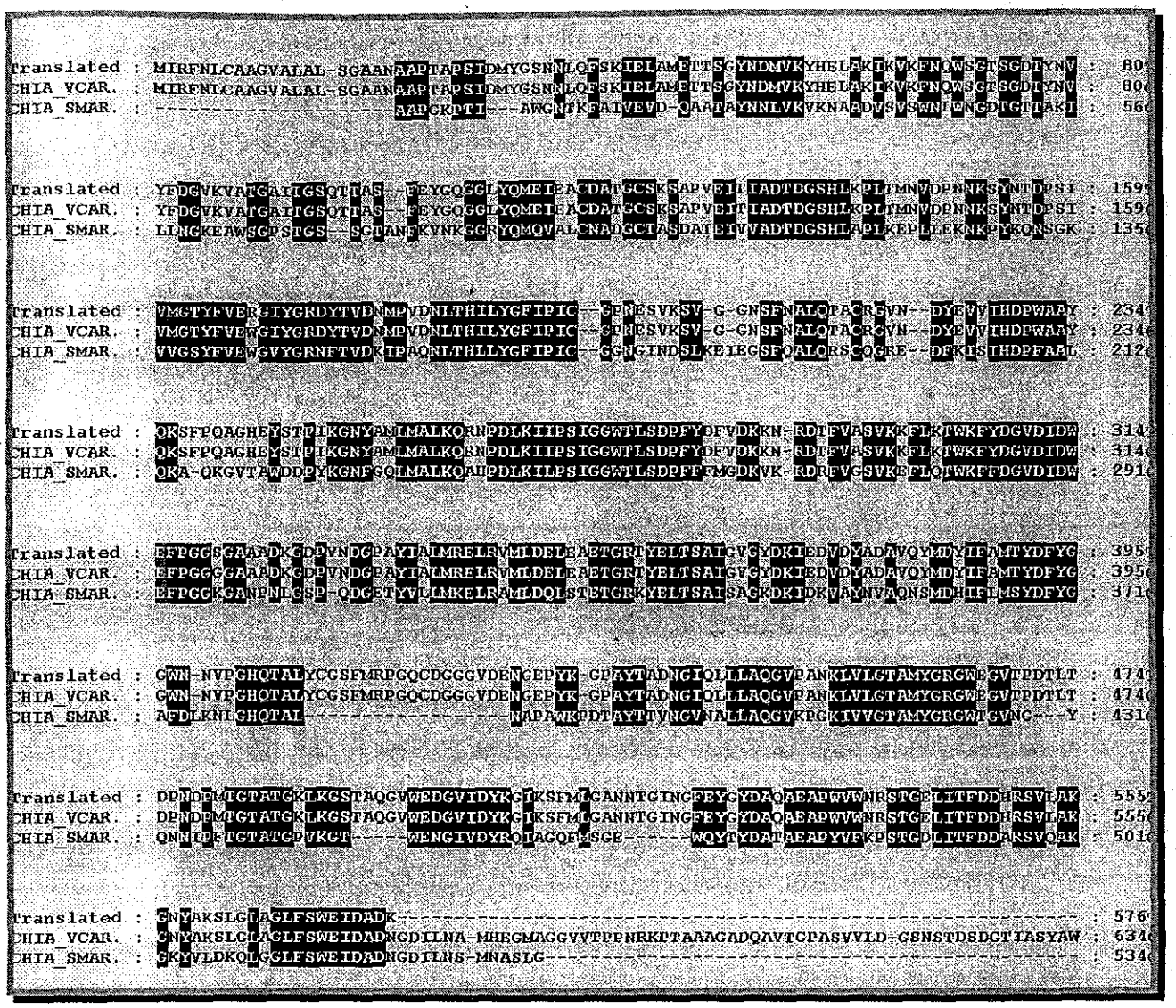
หลังจากทำการสกัดพลาสมิดของโคลน GC6 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7 kb ที่ย่อยด้วย *Kpn*I และส่งไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ โดยใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์ 2 ตัวคือ M13 forward และ M13 reverse เป็น primer หลังจากนั้นทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองเส้น (sense strand และ non-sense strand) ของ DNA insert โดยวิธี nucleotide walking จากนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม SEQMAN ที่มีใน DNA Star package แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์พบว่าให้ open reading frame (ORF) ที่ยาวที่สุดขนาด 1,740 นิวคลีโอไทด์ซึ่งถอดให้สายโพลีเพปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 580 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 63,178 ดาลตันและมีค่า pI เป็น 4.71 รูปที่ 3.6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และ translated amino acid ของ ORF ขนาด 1.7 kB



รูปที่ 3.6 แสดง open reading frame จาก DNA insert ของโคลน C6 ที่ถอดระหัสให้เอ็นไซม์ไคติเนส การวิเคราะห์ดีเอ็นเอทำโดยโปรแกรม MapDraw ที่มีอยู่ใน DNA Star package

การวิเคราะห์หาตำแหน่งของ signal peptide โดยโปรแกรม SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) โดยพบว่าสายโพลีเพปไทด์ที่ได้น่าจะมี signal peptide ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 21 ตัวมีลำดับกรดอะมิโนเริ่มที่ปลายด้านอะมิโนดังนี้คือM-I-R-F-N-L-C-A-A-G-V-A-L-A-L-S-G-A-A-N-A ดังนั้นสายโพลีเพปไทด์ที่ได้น่าจะมีกรดอะมิโนหลังจากถูก secreted แล้วเริ่มที่กรดอะมิโนตัวที่ 22 ตั้งแต่ A-P-T-A-P-S-I-D-... เป็นต้นไป

เมื่อทำการ submit ลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ใน BlastP พบว่าโพลีเพปไทด์ที่ได้ซึ่งเรียกว่า Valg283_ChiA มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. harveyi* เชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์อื่น และเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 80-86% เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ Valg283_Chi A กับกรดอะมิโนของไคติเนส เอ อื่น ๆ ที่ทราบโครงสร้างสามมิติคือไคติเนส จาก *V. carchariae* จาก *S. marcescens* และจาก *Bacillus circulans* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน คือ 98.8% 45.9% และ 16.6. % ตามลำดับ รูปที่ 3.7 แสดงการเปรียบลำดับของกรดอะมิโนของทั้งเอ็นไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียสามสปีชีส์

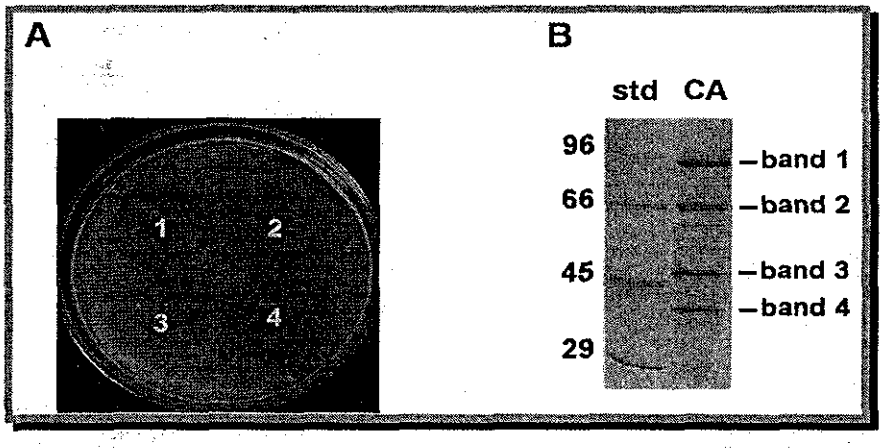


รูปที่ 3.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไคติเนสของ *V. alginolyticus* 283 (Translated); *V. carchairae* (CHIA_VCAR); และ *S. marcescens* (CHIA_SERMA) ส่วนกรดอะมิโน Glu ที่แสดงด้วยแถบสีแดงคือ catalytic residue

3.3. การแยกเอ็นไซม์ไคติเนสและโปรตีนที่จับจำเพาะกับไคตินจากแบคทีเรีย *V. alginolyticus* 283

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียในทะเล *Vibrios* จำนวน 12 สปีชีส์ [27] ในจำนวนทั้งหมดพบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 และ *V. carhcariae* สามารถผลิตไคติเนสในปริมาณมากโดยที่ *V. carchariae* ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส เอ ขนาด 63 kDa เป็นเอ็นไซม์หลัก แต่ *V. alginolyticus* 283 จะผลิตไคติเนสหลาย ๆ ไอโซไซม์ ในการวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้างและหน้าที่ของเอ็นไซม์ไคติเนส เอ ที่สกัดจาก *V. carchariae* โดยละเอียด [27,31,32,33] ในการศึกษาครั้งนี้มีความต้องการศึกษาระบบของเอ็นไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายไคตินโดยแบคทีเรีย *V. alginolyticus* 283ให้ละเอียดขึ้น จึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินเป็น

ตัวเหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 คืนที่อุณหภูมิ 30°ซ หลังจากนั้นปั่นเก็บส่วนของอาหารเหลวที่มีโปรตีนถูกหลั่งออกมาโดยแบคทีเรียไปผ่านโครมาโตรกราฟฟีแบบจำเพาะโดยมี colloidal chitin เป็นตัวจับ (chitin-affinity chromatography) แล้วทำการชะโปรตีนที่จับกับไคตินออกด้วย 2M guanidine HCl แล้วนำมาวิเคราะห์บน 12% SDS/PAGE รูปที่ 3.8A แสดงการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรีย *V. alginolyticus* 283 บนอาหารแข็งที่มีไคติน ส่วนรูปที่ 3.8B แสดงโปรตีนที่ถูกชะออกมาจาก chitin affinity chromatography



รูปที่ 3.8 การวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกชะออกมาจาก chitin affinity chromatography ด้วย SDS/PAGE (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)[34]

รูป A แสดงการผลิตไคตินของ *V. alginolyticus* 283 บนอาหารแข็งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ

รูป B แสดง SDS/PAGE ของแถบโปรตีนที่จับแบบจำเพาะกับไคตินที่ถูกชะออกมาจาก chitin affinity chromatography

จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยวิธี SDS/PAGE พบว่ามีแถบโปรตีน 4 แถบหลักขนาด 90 kDa 66 kDa 47 kDa และ 38 kDa ที่ย้อมติดสี Coomassie blue เมื่อทำการตัดแถบโปรตีนทั้งสี่แล้วนำไปย่อยให้ได้เพปไทด์สายสั้น ๆ ด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน แล้วนำเพปไทด์ที่ได้ไปทำ peptide mass fingerprinting โดยวิธี HPLC ESI/MS แล้วทำการเทียบมวลของเพปไทด์กับโปรตีน protein database ผลการทำ Sequest search แสดงในที่ตารางที่ 3.1 พบว่ามี 4 เพปไทด์ของแถบโปรตีนขนาดใหญ่ที่สุดคือ 90 kDa ที่มี m/z 1404.68, 1724.81, 2148.98, และ 2186.97 ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 65 kDa มีเพปไทด์ 3 เส้นที่มี m/z 1561.77, 1404.68 และ 1724.81 และ แถบโปรตีนขนาด 45 kDa ให้ชิ้นเพปไทด์ที่มี m/z 1561.77, 1404.68, 1516.75 และ 1724.81 ที่ให้ลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับส่วนของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 [GenBank Accession number:28899910] ส่วนแถบโปรตีนที่เล็กที่สุดขนาด 38 kDa ให้เพปไทด์ที่มีค่า m/z 1345.66 และ 864.47 ที่ให้ลำดับของกรดอะมิโนมีความเหมือนกับส่วนของโปรตีนที่เยื่อเซลล์ malto-inducible porin จากเชื้อ *Aeromonas salmonicida* (GenBank Accession number:398211)

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการทำ Sequest search ของ tryptic peptides ของแถบโปรตีนที่ชะออกมาจาก chitin affinity chromatography แล้ววิเคราะห์หา m/z ด้วย HPLC ESI/MS (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)

Chitin binding proteins identified by HPLC–ESI/MS

Band number (#)	Monoisotopic mass (MH+)	Charge, Z	Peptide sequence	Identified protein	Accession number
1. 90 kDa	1404.68	3	R.TTGELITFDDHR.S	Chitinase from *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633	28899910
	1724.81	2	K.GSTAQGVWEDGVIDYK.G		
	2148.98	2	K.WWTQGDDPSKSGEWGVWK.E		
	2186.97	2	K.FYDGVDIDWEFPGGGAAADK.G		
2. 65 kDa	1561.77	2	K.SEPQAGHEYSTPIK.G	Chitinase from *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633	28899910
	1404.68	2	R.TTGELITFDDHR.S		
	1724.81	2	K.GSTAQGVWEDGVIDYK.G		
3. 47 kDa	1561.77	2	K.SEPQAGHEYSTPIK.G	Chitinase from *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633	28899910
	1404.68	2	R.TTGELITFDDHR.S		
	1516.75	2	R.TYELTSAIGVGYDK.I		
	1724.81	2	K.GSTAQGVWEDGVIDYK.G		
4. 38 kDa	1345.66	2	K.TVLQYGTEGYSK.T	Maltose-inducible porin from *Aeromonas salmonicida*	398211
	864.47	2	K.VSIAWVR.T		

Peptide fragments from gel bands 1–4 (see Fig. 1b) were identified by exact mass analysis using HPLC–ESI/MS and by database searching. Monoisotopic masses of the identified bands gave highest scores in the FASTA search.

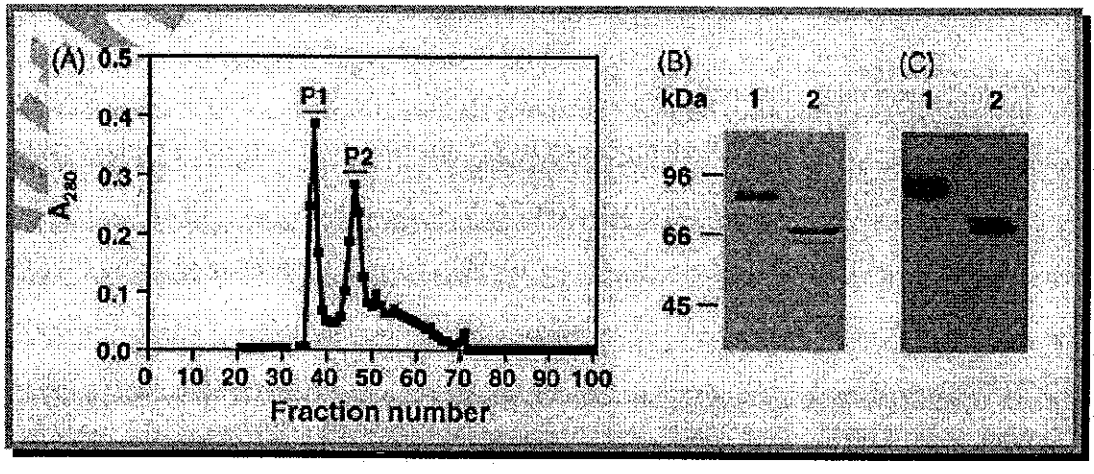
จากผลการทดลองแสดงชี้ให้เห็นว่าโปรตีนขนาด 95 kDa 65 kDa และ 47 kDa น่าจะเป็นเอ็นไซม์ไคติเนสเนื่องจากมีมวลของเพบไทด์ที่เหมือนกับเอ็นไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์ใกล้เคียงกันกับ *V. alginolyticus* 283 นอกจากนี้ยังสังเกตุเห็นได้อีกว่าเพปไทด์ของโปรตีน 3 แถบแรก ที่ให้ค่า m/z ที่เหมือนกันอย่างน้อยอย่างน้อย 2 เพปไทด์ คือ 1404.68 และ 1724.81 ซึ่งอาจบ่งบอกถึงว่าโปรตีนทั้งสามน่าจะมีลำดับของกรดอะมิโนบางส่วนคล้ายคลึงกันและอาจมีความสัมพันธุ์กันในเชิงวิวัฒนาการ เช่นอาจถูกสร้างมาจายีนตัวเดียวกันแล้วหลังจากนั้นขบวนการ post-translational modification อาจทำมีการเปลี่ยนแปลงสายโพลีเพปไทด์สุดท้ายที่มีขนาดต่าง ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติในการสลายไคตินได้เหมือนกัน ในงานวิจัยนี้เป็นไปได้ว่าโปรตีนขนาด 47 kDa และ 65 kDa อาจถูกสร้างมาจากโปรตีนขนาด 90 kDa ดังที่พบในเอ็นไซม์ไคติเนส เอ ขนาด 63 kDa จากเชื้อ *V. carchariae* ที่ถูกสร้างจาก chitinase precursor ขนาด 95 kDa ผ่านกระบวนการ C-terminal processing [32]

ส่วนโปรตีนพอรินขนาด 38 kDa ที่ตรวจพบได้มีลักษณะโปรตีนเยื่อเซลล์ทำหน้าที่เป็นช่องนำสารอาหารและของเสียเข้า-ออกเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรีย *Vibrios* สร้างเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อทำการสลายไคตินให้เป็นไคโตไบโอส แล้วนำผ่านเข้าเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์ การตรวจพบพอรินที่จับแบบจำเพาะกับไคตินอธิบายได้ว่าพอรินนี้อาจทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของน้ำตาลโมเลกุลคู่คือ $[GlcNAc]_2$ เข้าสู่แบคทีเรีย ได้มีข้อเสนอจาก Roseman และคณะ [35] ว่าเมทาบอลิซึมของไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์

ของเชื้อ *V. furnissei* ต้องผ่านการนำ GlcNAc เข้าสู่เซลล์ผ่านช่องพอรินพิเศษเรียกว่า "chitoporin" ที่ฝังอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียนี้โดยกระบวนแพร่

3.4. การทำบริสุทธิ์และการศึกษาทางจลศาสตร์เอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65

ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอ็นไซม์ไคติเนสสองขนาดคือ 90 kDa และ 65-kDa (เรียกเอ็นไซม์นี้ว่า Chi-65) ดังนั้นหลังจากขั้นตอน chitin affinity chromatography แล้วจึงได้ทำการทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไปโดยการผ่านส่วน "CA" เข้าไปในคอลัมน์ Sephacryl-S200® HR (1.5 cm x 120 cm) ดังที่อธิบายในรายละเอียดตามขั้นตอนที่ 2.8. แล้วนำ fraction แต่ละ fraction ที่เก็บได้มาตรวจหาโปรตีนโดยการวัดค่า A_{280} พบว่ามี peak โปรตีนแยกออกมา 2 peak (รูปที่ 3.9A) จึงทำการรวม peak ที่ออกมาก่อนแล้วให้ชื่อว่า 'P1' และทำการรวม peak ที่แยกออกมาทีหลังให้ชื่อว่า 'P2' เมื่อนำส่วน P1 และ P2 ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS/PAGE (รูปที่ 3.9B) พบว่าโปรตีน P1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 kDa ส่วน P2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 kDa จึงเรียกส่วน P1 ว่า Chi-90 และส่วน P2 ว่า Chi-65 ตามลำดับ ส่วนรูปที่ 3.9C แสดงการทำปฏิกิริยาของโปรตีน Chi-90 และ Chi-65 กับ anti-chitinnase antibodies



รูปที่ 3.9 แสดงการวิเคราะห์โปรตีน Chi-90 และ Chi-65 ด้วย SDS/PAGE (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)

รูป A แสดง protein profile ที่แยกได้จาก Sephacryl S200® HR gel filtration chromatography ส่วน P1 ได้จากการรวม fraction ที่ 36-38 ส่วน P2 ได้จากการรวม fraction ที่ 45-47

รูป B แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน P1 (ช่องที่ 1) และโปรตีน P2 (ช่องที่ 2)

รูป C แสดง Western blotting ของโปรตีน P1 (ช่องที่ 1) และโปรตีน P2 (ช่องที่ 2) โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A เป็นตัวจับ

ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน Chi-90 และ Chi-65 โดยผ่านขั้นตอน chitin affinity chromatography ตามด้วย Sepharcryl 200 ®HR gel filtration พบว่าโปรตีน Chi-90 ให้ค่า specific activity เป็น 0.65 μmol pNP/mg protein ส่วนโปรตีน Chi-65 ให้ค่า specific activity เป็นสูงกว่าประมาณ 1.5 เท่าคือ 1.01 μmol pNP/mg protein

ตารางที่ 3.2 การทำบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U mg^{-1})	Fold purification
Growth medium (GM)	2034.0	142.76	0.07	–
Chitin affinity (CA)	29.5	5.40	0.18	2.6
Sephacryl 200 (S200)				
Pooled 90 kDa fractions (P1)	1.05	0.68	0.65	9.3
Pooled 65 kDa fractions (P2)	1.45	1.47	1.01	14.4

ส่วน yield ของโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1.5 ลิตรที่มี 3% (w/v) colloidal chitin สำหรับโปรตีน Chi-90 และ Chi-65 คือ 1.05 mg และ 1.45 mg ตามลำดับ เมื่อได้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วในขั้นต่อมาคือการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ทั้งสองโดยใช้ pNP-$[GlcNAc]_2$ เป็นสับสเตรท จากตารางที่ 3.3 พบว่าค่า K_m ของเอ็นไซม์ Chi-90 มีค่าเป็น 0.34 mM ซึ่งเป็นครึ่งหนึ่งของค่า K_m ของ Chi-65 ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ Chi-90 มีความชอบต่อสับสเตรทมากกว่า Chi-65 เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า turnover (k_{cat}) พบว่า Chi-65 มีค่าเป็น 7.41 ต่อวินาที ซึ่งสูงกว่าค่าของ Chi-90 ซึ่งมีค่าเป็น 1.65 ต่อวินาที อยู่ถึง 4.5 เท่าแสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ Chi-65 เร่งปฏิกิริยาการสลาย pNP-glycoside ได้ดีกว่าเอ็นไซม์ Chi-90 และพิจารณาจากค่า k_{cat}/K_m จากตารางที่ 3.3 พบว่าประสิทธิภาพในการสลายสับสเตรทของ Chi-65 ดีกว่า Chi-90 อยู่ 2.3 เท่า

ตารางที่ 3.3 การศึกษาทางจลศาสตร์ของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 โดยใช้ pNP$[GlcNAc]_2$ เป็นสับสเตรท (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)

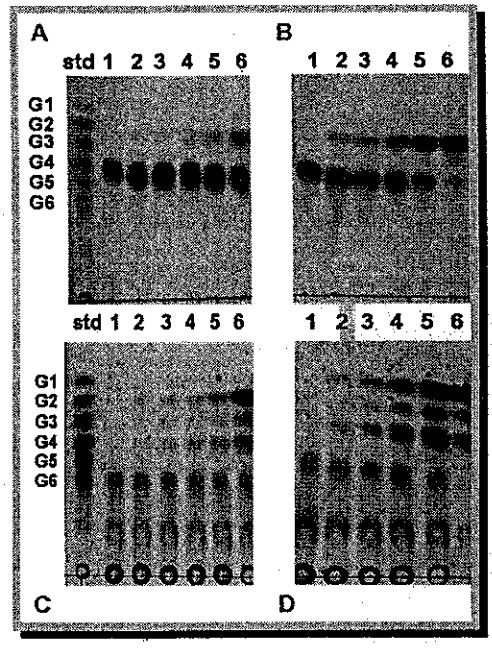
Enzyme	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})
Chi-90	0.34 ± 0.07	1.65 ± 0.19	4.81×10^3
Chi-65	0.67 ± 0.06	7.41 ± 0.47	1.11×10^4

จากการทดสอบผลของ pH ต่อปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทพบว่าเอ็นไซม์ทั้งสองมีค่า optimum pH อยู่ที่ค่าเดียวกันคือ pH 6.5 และมีลักษณะกราฟระหว่างค่า pH กับอัตราเร็วคล้ายคลึงกัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้น่าจะ

ให้ข้อมูลว่าเอ็นไซม์ Chi-90 อาจจะทำหน้าที่เป็นโปรตีนต้นตอของเอ็นไซม์ Chi-65 ก็ได้ อย่างไรก็ตาม ข้อสรุปดังกล่าวยังไม่ชัดเจนนักเนื่องจากจากการตรวจหาลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายด้าน N พบว่า Chi-65 มีลำดับกรดอะมิโน 20 ตัวแรกเป็น A-P-Q-A-P-S-I-D-M-Y-T-S-N-N-L-Q-F-V-A-I แต่ไม่สามารถหาลำดับของกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ Chi-90 ได้เนื่องจากโปรตีนที่เตรียมได้มีปริมาณน้อยเกินไป

3.5. การทดสอบความสามารถในการสลายไคตินของเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 โดยวิธี TLC

งานวิจัยต่อมาคือการเปรียบเทียบความสามารถของเอ็นไซม์ทั้งสองในการสลายไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ผลการทดลองที่ได้พิจารณาจากผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยาการสลาย G2-G6 แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC พบว่า Chi-90 ไม่สามารถสลายน้ำตาลไคโตไบโอสและไคโตไตรโอส (G2 และ G3) ได้เลย ส่วนเอ Chi-65 ไม่ใช้ G2 แต่สามารถสลาย G3 ได้เป็น G1+G2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสลายสับสเตรทของ Chi-65 เกิดขึ้นที่พันธะที่สองของสายน้ำตาล ข้อมูลนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ศึกษามาก่อนหน้าแล้วกับเอ็นไซม์ไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. carchariae* [33]

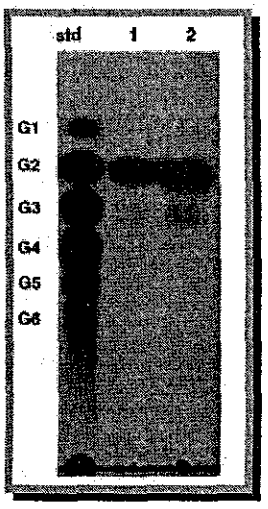


รูปที่ 3.10 การวิเคราะห์ผลิตผลจากปฏิกิริยาการสลาย G4 และ G6 โดยเอ็นไซม์ Chi-90 และ Chi-65 ด้วยเทคนิค TLC (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)
รูป A และ C แสดงการสลาย G4 และ G6 ของ Chi-90 ส่วนรูป B และ D แสดงการสลาย G4 และ G6 ของ Chi-65 ช่องที่ 1: G1-G6 standard mix; 2-6: เวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 0, 2.5, 5, 10, 30 และ 60 นาที

รูปที่ 3.10 แสดงผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาการสลาย โดยวิเคราะห์หาผลิตผลที่ได้จากการสลายน้ำตาลไคโตเตตระโอส (G4) และไคโตเฮกซะโอส (G6) โดยวิธี TLC เมื่อใช้ G4 เป็นสับสเตรท ตรวจพบผลิตผล

G2 เพียงชนิดเดียว โดย G2 ที่พบในปฏิกิริยาที่มี Chi-90 พบที่เวลาน้อยที่สุด 5 นาทีและที่เวลา 60 นาที (รูปที่ 3.10A) พบผลิตผลมากขึ้นแต่จะสังเกตุเห็นสับสเตรท G4 เหลืออยู่เป็นปริมาณมาก ในกรณีของ Chi-65 ตรวจพบ G2 ที่เวลาน้อยที่สุดคือ 2.5 นาทีและที่เวลา 60 นาที (รูปที่ 3.10B) พบว่าสับสเตรททั้งหมดถูกสลายให้ได้ G2 เกือบหมด

ส่วนรูปที่ 3.10 C และ D แสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์สลาย G6 ให้ได้เป็นผลิตผลสามชนิดคือ G2, G3 และ G4 โดย G2 และ G4 เป็นผลิตผลหลัก ส่วน G3 เป็นผลิตผลรอง โดยที่ Chi-90 จะสลาย G6 ได้ไม่หมดที่เวลาในการทำปฏิกิริยา 60 นาทีในขณะที่ Chi-65 สามารถสลาย G6 จนหมดในเวลาเดียวกัน ผลิตผล G3 ที่ได้บ่งชี้ว่าเอ็นไซม์ทั้งสองสามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่บริเวณกลางสายน้ำตาลได้นอกเหนือจากพันธะที่สอง ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานของเอ็นไซม์ที่มีเอ็นโดแอคติวิตี้คือย่อยพันธะไกลโคซิดิกได้หลายตำแหน่งของสายน้ำตาล สับเสตรทที่หลงเหลืออยู่จากการสลายด้วยเอ็นไซม์ Chi-90 แสดงว่าปฏิกิริยาการสลายเกิดขึ้นช้ากว่าปฏิกิริยาที่กระทำโดยเอ็นไซม์ Chi-65 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองทางจลศาสตร์ที่ค่า k_{cat} ของ Chi-90 มีค่าน้อยกว่า k_{cat} ของ Chi-65 อยู่ 4.5 เท่าดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 3.4.



รูปที่ 3.11 การวิเคราะห์ผลิตผลจากปฏิกิริยาการสลาย colloidal chitin โดยเอ็นไซม์ Chi-90 (ช่องที่ 1) และ Chi-65 (ช่องที่ 2) ด้วยเทคนิค TLC (แหล่งที่มา: Suginta, Enz. Microb. Tech, 2007, 41:212-220)

ส่วนการสลายไคตินของเอ็นไซม์ทั้งสองแสดงในรูปที่ 3.11 พบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยา 60 นาที ผลิตผลที่ได้คือ G2 และ G3 โดยที่ G2 เป็นผลิตผลหลักและ G3 เป็นผลิตผลรอง และพบว่า Chi-65 สามารถสลายไคตินได้ดีกว่า Chi-90 เช่นเดียวกับผลการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เริ่มต้นด้วยการสกัดจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 และการเตรียม genomic library ของดีเอ็นเอดังกล่าวโดยการตัดดีเอ็นเอให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3*AI หลังจากนั้นเลือกโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3-8 kb เข้าไปในพลาสมิด pBluescript II KS(-) และการ นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไปใน *E. coli* DH5α จากนั้นได้ทำการตรวจสอบหายีนไคติเนสจากจำนวนโคลนทั้งหมดโดยวิธี immuno screening โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies เป็นตัวจับแบบจำเพาะ หลังจากนั้นได้เลือกสุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีมา 6 โคลนคือ โคลน C1-C6 มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนส ผลของ SDS-PAGE และ immunoblotting แสดงให้เห็นว่าโคลนทั้งหมดที่เลือกมาศึกษามีชิ้น DNA insert ขนาด 7 kB มีส่วนของยีนแสดงออกให้เอ็นไซม์ไคติเนสขนาด 63 kDa ที่มีความสามารถในการสลาย glycol chitin ได้ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสที่ได้โดยการทำ DNA sequencing พบว่าลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนสประกอบด้วย open reading frame ขนาด 1,740 นิวคลีโอไทด์ซึ่งถอดให้สายโพลีเพปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 580 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณได้เท่ากับ 63,178 ดาลตันและมีค่า pI เป็น 4.71 การวิเคราะห์ตำแหน่งของ signal peptide พบว่าน่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 21 ตัวแรก มีลำดับกรดอะมิโนคือ M-I-R-F-N-L-C-A-A-G-V-A-L-A-L-S-G-A-A-N-A การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ไคติเนสจาก *V. alginolyticus* 283 กับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียอื่น ๆ พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับไคติเนสจากเชื้อ *V. carchariae* มากที่สุดคือ 98.8% และมีความเหมือนกับไคติเนสจากเชื้อ *B. circulans* น้อยที่สุดคือ 16.6%

งานวิจัยขั้นต่อมาคือการสกัดและตรวจหาโปรตีนที่จับแบบจำเพาะกับไคตินจากเชื้อเดียวกัน หลังจากการผ่าน crude extract ของเซลล์ *V. alginolyticus* 283 ไปผ่าน chitin affinity chromatography แล้วชะด้วย 2M guanidine HCl แล้ววิเคราะห์โปรตีนที่ได้โดยการทำ SDS/PAGE พบว่ามีแถบโปรตีน 4 ขนาดคือ 90 kDa 65 kDa 47 kDa และ 38 kDa เมื่อทำการย่อยโปรตีนทั้งหมดด้วยเอ็นไซม์ทริปซินแล้วตรวจหาชนิดของโปรตีนด้วย HPLC ESI/MS และการทำ peptide mass fingerprinting พบว่าโปรตีน 3 แถบแรกถูกจำแนกเป็นเอ็นไซม์ไคติเนสส่วนโปรตีนแถบที่เล็กที่สุดถูกจำแนกเป็นช่องพอริน การทำบริสุทธิ์ของโปรตีนขนาด 90 kDa และ 65 kDa อาศัยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีสองขั้นตอนคือ chitin affinity chromatography ตามด้วย Sephacryl S200®HR gel filtration โปรตีนทั้งสองทำสามารถเกิด cross-reactivity กับ anti-chitinase polyclonal antibodies ที่สร้างโดยใช้ไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* และสามารถสลายสับสเตรทไคติน ไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และ pNP-$[GlcNAc]_2$ ได้แต่เอ็นไซม์ไคติเนสขนาด 90 kDa (Chi-90) มีแอคติวิตี้ในการสลายสับสเตรททั้งหมดต่ำกว่าเอ็นไซม์ไคติเนสขนาด 65 kDa (Chi-65) โดยเมื่อทดสอบกับ pNP-$[GlcNAC]_2$ พบว่าค่า specific activity ของ Chi-90 มีค่าน้อยกว่า Chi-65 อยู่ 1.5 เท่า แต่ถ้าเปรียบเทียบค่า turnover number

(k_{cat}) ของการสลายสับสเตรทตัวเดียวกันพบว่า Chi-90 มีค่า k_{cat} ต่ำกว่า Chi-65 อยู่ 4.5 เท่า การตรวจหาผลิตผลที่ได้จากการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์พบว่าเอ็นไซม์ทั้งสองไม่สามารถสลายไคโตไบโอสได้ น้ำตาลตัวแรกที่ทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของเอ็นไซม์ Chi-90 คือไคโตเตตระโอสโดยผลิตผลของการสลายคือ G2+G4 ส่วนน้ำตาลไคโตไตรโอสเป็นสับสเตรทตัวแรกของ Chi-65 ให้ผลิตผลของการสลายเป็น G2+G1 การสลายน้ำตาล G6 ของเอ็นไซม์ทั้งสองตัวให้ผลิตผลสามชนิดคือ G1, G2 และ G3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Chi-90 และ Chi-65 มีคุณสมบัติเป็นเอนโดไคติเนส การสลายสายไคตินโพลีเมอร์ของทั้งสองเอ็นไซม์ให้ผลิตผลหลักเป็นไคโตไบโอสและผลิตผลรองเป็นไคตินโมโนเมอร์ การทดสอบผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ให้ค่า optimum pH ของทั้งสองเอ็นไซม์ที่ pH 6.5 และจากผลการตรวจสอบที่พบว่าเอ็นไซม์ทั้งสองมีมวลของบางเพปไทด์ที่เหมือนกัน ทำให้ได้ข้อสรุปว่าเอ็นไซม์ Chi-90 อาจเป็นโปรตีนต้นตอของ Chi-65

4.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

บรรณานุกรม

[1] Gooday, G.W. (1994) In C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publisgers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312.

[2] Davis, B., and Eveleigh, D.E. (1984) In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.

[3] Papavizas, C.G. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54.

[4] Cabib, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 59-101.

[5] Kuranda, M., Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 19758-19767.

[6] Srivastava, A.K., Defago, G., Boller, T. (1985) Secretion of chitinase by *Aphanocladium album*, a hyperparasite of wheat rust. *Experientia.* 41, 1612-1613.

[7] Sivan, A., Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682.

[8] Jeuniaux C. (1966) Chitinases. *Methods Enzymol.* 8, 644-650.

[9] Okutani, K. (1977) Chitin digestion in the digestive tract of fish. *Proc. First Int. Confer. Chitin/Chitosan*, Boston MA (*USA*), April[11th-13th], 1977, 554-562.

[10] Okutani, K., Sawada, T., Kimata, M. (1967) Studies of chitinolytic enzymes in aquatic animals -VI. The chitinolytic enzyme present in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33, 952-955.

[11] Spindler-Barth, M. (1993) Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines. In Chitin Enzymology (Muzzarelli, R.A.A., ed.), European Chitin Society, *Italy*, 75-82.

[12] Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vogeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31.

[13] Pleban, S., Chernin, L., Chet, I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett Appl. Microbiol.* 25, 284-288.

[14] De Jong, A.J., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerchhove, J., van Kammen, A., de Vries, S.C. (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4, 425-433.

[15] Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. A physical function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 266, 24260-24267.

[16] Montgomery, M.T., Kirchman, D.L. (1993) Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Micriobiol.* 59, 373-379.

[17] Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y.C., Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.* 266, 2476-2486.

[18] Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzyki K., Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* 172,4107-4022.

[19] Svityl, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., Kirchman, D.L. (1997) Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 408-413.

[20] Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., Vorgias, C.E. (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169-1180.

[21] Wang, S.H., Zheng, H.J., Dissanayake, S., Cheng, W.F., Tao, Z.H., Lin, S.Z., Piessens, W.F. (1997) Evaluation of recombinant chitinase and SXP1 antigens as antimicrofilarial vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 474-481.

[22] Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., Harman, G.E. (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7860-7865.

[23] Carroad, P.A., Tom, R.A. (1978) Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of microorganisms. *J. Food. Sci.* 43, 1158-1161.

[24] Cosio, I.G., Fisher, R.A., Carroad, P.A. (1982) Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.* 47, 901-905.

[25] Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struh, L.K. (1994) Preparation and analysis of DNA. In Current Protocols in Molecular Biology. (Ausibel, F.M., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struh, L.K., ed.). Sections 2.4.1-2.4.5 (2), John Wiley & Son. Inc., *U.S.A*

[26] Sedgwick, S.G., thi Man, N., Ellis, J.M., Crowne, H., Morris, G.E. (1991) Rapid mapping by transposon mutagenesis of epitopes on the muscular dystrophy protein, dystrophin. *Nucleic Acids Res.* 19, 5889-5894.

[27] Suginta, W., Robertson, P.A.W., Austin, B., Fry, S.C., Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae. J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84.

[28] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*68, 850–858.

[29] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

[30] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

[31] Suginta, W., Songsiriritthigul, C., Kobdaj, A., Opassiri, R., Svasti, J. (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *Biochim. Biophys. Acta* 177,1151-1160.

[32] Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R.R., Svasti, J., Fothergill-Gilmore, L.A. (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 424,171-180.

[33] Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J., Prinz, H. (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS. J.* 272, 3376-386.

[34] Suginta, W. (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb. Tech.* 41,212-220.

[35] Keyhani, N.O., Li, X.B., Roseman, S. (2000) Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification and molecular cloning of a chitoporin. *J. Biol. Chem.* 275, 33068-33076.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และสับสเตรท

Marine Medium 2216E

Per litre:

To 950 ml of filtered, aged sea water add:

Bacteriological peptone	5 g
$FePO_4$	0.10 g
bacto-yeast extract	5 g

Shake until solutes have dissolved. Adjust the pH to 7.5-7.6 with 1 N NaOH. Adjust the volume of the solution to 1 litre with filtered, aged sea water. Sterilize by autoclaving for 20 min at 15lb/sq. in. on liquid cycle.

CTAB/NaCl solution

Dissolve 4.1 g of NaCl in 80 ml of distilled-deionized water using a magentic stirrer and stir bar. While stirring, add 10 g CTAB (hexzadecyltrimethylammonium bromide). If needed, dissolve the CTAB by heating the solution to 65°C. Allow the solution to cool to room temperature. Adjust the final volume to 100 ml with distilled-deionized water.

Phosphate-buffered saline plus Tween 20 (PBS-T)

Dissolve 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.44 g of Na_2HPO_4, and 0.2 g of KH_2PO_4 in 800 ml of distilled H_2O. Adjust the pH to 7.4 with HCl. Add H_2O to 1 litre. Tween 20 (1% v/v) was added and stirred to prior use.

Colloidal chitin

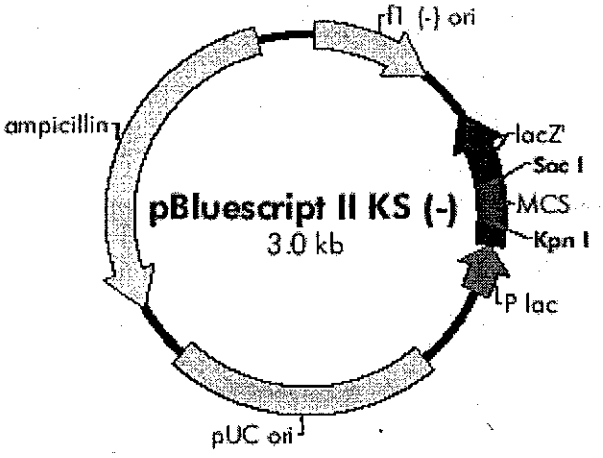
Chitin powder from crab shells (5 g) was added slowly into 60 ml of concentrated HCl and left at 4 °C overnight with vigorous stirring. The mixture was added to 2 litres of ice-cold 95% ethanol with rapid stirring and kept overnight at 25 °C. The precipitant was collected by centrifugation at 5000 ***g*** for 20 min at 4 °C and was washed with sterile distilled water until the colloidal chitin became neutral (pH 7.0). Colloidal chitin was stored at 4 °C until further applications.

Glycol chitin

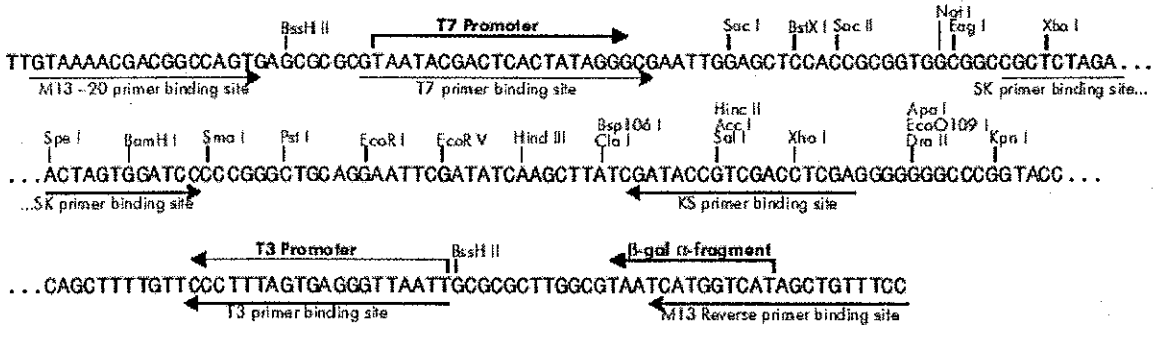
Five grams of glycol chitosan was dissolved in 100 mL of 10% acetic acid by grinding in a mortar, and the viscous solution was allowed to stand overnight at 22°C. Methanol was added, and the solution was vacuum filtrated through a Whatman No. 4 filter paper. The filtrate was transferred into a beaker and 7.5 mL of acetic anhydride was added. The gel was covered with methanol and homogenized. The suspension was centrifuged at 27,000 g for 15 min at 4°C. The gelatinous pellet was resuspended in 1 volume of methanol, homogenized, and centrifuged as in the preceding step. The pellet was resuspended in 500 mL distilled water containing 0.02% (m/v) sodium azide.

ภาคผนวก ข

แผนที่พลาสมิด pBluescript II KS(-)



pBluescript II KS (+/–) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)



ประวัตินักวิจัย

Name Dr. Wipa Suginta

Affiliation School of Biochemistry, Institute of Science,
Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand
Tel: +66 44 22 4313; E-mail wipa@sut.ac.th

Degree Ph.D. (Biochemistry), University of Edinburgh, UK
M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand
B.Sc. (Biochemistry), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Current Position Associate Professor in Biochemistry

Fellowships/Awards (year 2000 - present)

2006 Suranaree University of Technology Award for "Outstanding Academic Performance in Science"

2005 "For Women in Science Fellowship" from L'OREAL (Thailand) / UNESCO.

2004 A General Travel Grant from the Biochemical Society for a Study Visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.

2003 A DAAD Fellowship for a Study Visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.

Research Interest

1. Structure and function of bacterial porins
2. Structure and function of chitinases from marine bacteria

Publications

Research Articles

1. **Suginta W**, Pantoom S, and Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio harveyi* (formerly *Vibrio carchairae*) chitinase A as revealed by HPLC-MS. (Maunuscript prepared for submission to BBA-Proteins & Proteomics).
2. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W** (2008) Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes of the -1 sugar during substrate hydrolysis. *J. Struct Biol.*, under review.

3. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC-Biochemistry*, under review.

4. **Suginta W**, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA - General Subjects,* 1770, 1151-1160. (JIF2005 = 2.418).

5. **Suginta W** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb. Tech.*41, 212-220. (JIF2006 =1.897)

6. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H & **Suginta W** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae. Acta Cryst. Section F.* 61, 895-898. (Newly launched journal, journal impact factor has not been assigned)

7. **Suginta W,** Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae,* as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376-3386. (JIF2006 = 3.292)

8. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & **Suginta W** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* 384, 609–617. (JIF2005 = 4.224)

9. **Suginta W**, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180. (JIF2005 = 3.152)

10. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & **Suginta W** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis. Biochem. J.* 377, 579-587. . (JIF2005 = 4.224)

11. **Suginta W,** Karoulias N, Aitkin A & Ashley RH (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem. J.* 359, 55-64. . (JIF2005 = 4.224)

12. **Suginta W,** Robertson PAW, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae. J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84. (JIF2005 = 2.127)

13. Svasti J, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S & Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant

Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. *In Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.

14. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
15. **Suginta W** & Svasti MRJ (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *ScienceAsia* 21, 183-186.
16. **Suginta W** & Svasti J (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
17. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* 21, 293-303.

Recent Presentation in Scientific Meetings

1. **Suginta W** & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P14, *Invited oral presentation.*
2. **Suginta W.** Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P47. *Poster presentation.*
3. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & **Suginta W.** The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P53. *Poster presentation.*
4. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W.** The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P27. *Poster presentation.*

5. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W.** The effect of the *N*-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P61. *Poster presentation.*

6. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W.** Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P19. *Oral presentation.*

7. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W.** Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae.* 2nd Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC.*

8. **Suginta W.** On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15th, 2006. *Invited oral presentation.*

9. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae.* 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation.*

10. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A & **Suginta W** Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of chitinases A from *Vibrio carchariae.* 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P335. *Poster presentation.*

11. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae.* 2nd Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23th-24th, 2005. *Invited oral presentation.*

12. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & **Suginta W** Porin from *Burkholderia pseudomallei* and B. *thailandensis.* In 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July2nd-7th, 2005. *FEBS J. Vol.* 272, *Supp.* 1, P389. *Poster presentation.*

13. Songsiriritthigul C, Robinson RC, Yuvaniyama J & **Suginta W** Expression, purification, and preliminarily structural analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae.* The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P164. *Poster presentation.*

14. Siritapetawee J & **Suginta W** Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P5. *Poster presentation.*
15. **Suginta W**, Svasti J & Prinzs H Enzymatic properties of a family 18 chitinase a from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI mass spectrometry, Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22th-23th, 2003, *Invited oral presentation.*
16. Siritapetawee J, Ashley RH, Prinz H, Samosornsuk W & **Suginta W** Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Invited oral Presentation.*
17. **Suginta W** *C*-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Oral presentation.*
18. Sun Q, McDonald A, **Suginta W** & Ashley RH (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans.* A112. *Poster Presentation.*
19. **Suginta W** & Ashley RH (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference)*, P57. *Poster presentation.*
20. **Suginta W,** Estibeiro P, Rigden DJ & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J.* P417A. *Poster presentation.*