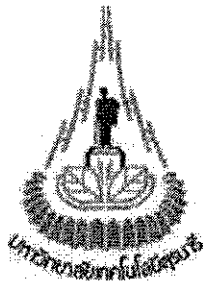
รหัสโครงการ SUT3-304-49-24-15



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น
ENTEROKINASE LIGHT CHAIN CLONING AND PRODUCTION

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นครราชสีมา 30000

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวชนิดา กุประดิษฐ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2549-2550

ธันวาคม 2550

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ และ ดร.รจนา โอภาศิริ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำในงานวิจัยส่วนของการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์และในส่วนของงานทางด้านชีวเคมี รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยในส่วนของการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาในงานวิจัยส่วนของกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ *P. pastoris*

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ, ชีวเคมี และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัยนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2549-2550

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2550

บทคัดย่อ

เอนเทอโรไคเนสเป็นเอ็นไซม์จำพวกซีรีนโปรติเอสซึ่งจะตัดพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ของตำแหน่งตัดจำเพาะ (Asp_4Lys) และเนื่องจากเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสามารถทำงานได้ในสภาวะที่หลากหลาย จึงทำให้เอนเทอโรไคเนสมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ตัดฟิวชันโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้นในระบบรีคอมบิแนนท์ (rEK_L) จากลำไส้วัว

จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอของยีนเอนเทอโรไคเนสสายสั้น (EK_L) จากลำไส้วัวและควายในประเทศไทยโดยเทคนิค RT-PCR และ nested PCR พบว่า ผลิตภัณฑ์ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาด 708 คู่เบส และทำนายลำดับกรดอะมิโนได้ 235 กรดอะมิโน ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากควายที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากวัวที่มีการรายงานจากงานวิจัยที่ผ่านมา และพบว่ากรดอะมิโนของยีน EK_L จากวัวในประเทศไทยมีความแตกต่างเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ในขั้นตอนการชักนำยีน EK_L จากวัวที่ได้นี้ให้เกิดการแสดงออกและทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่า rEK_L ที่ผลิตโดยใช้ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ Y11430 สามารถทำงานได้และสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์นี้ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยง *Pichia* ในถังหมักในช่วงที่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอ็นไซม์นี้ในระบบรีคอมบิแนนท์ด้วยเมธานอล ในระหว่างกระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกนั้นพบว่า การผลิตเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิต่ำนั้นไม่สามารถปรับปรุงคุณภาพของเอ็นไซม์ที่ผลิตให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น แต่สามารถเพิ่มผลผลิตของโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์ได้ หลังจากสิ้นสุดกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุพบว่า ความเข้มข้นของ rEK_L บริสุทธิที่ได้คือ 433 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ rEK_L ที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับความสามารถในการตัดฟิวชันโปรตีนที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ EK (Asp_4Lys) พบว่า rEK_L ที่บริสุทธิ์ซึ่งได้จากงานวิจัยนี้สามารถตัดสับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีนของ rice BGlu1-thioredoxin ได้เมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชันโปรตีนด้วย rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้และ rEK_L ที่ผลิตขายตามท้องตลาดนั้นมีรูปแบบของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจล SDS-PAGE คล้ายคลึงกัน

Abstract

Enterokinase is a serine protease which catalyzes the hydrolysis of peptide bonds at the C-terminal end of the specific cleavage site $(Asp)_4Lys$. It retains full activity in various reaction conditions, which makes it suitable for site-specific cleavage of fusion proteins. In this research, cloning and production of recombinant bovine enterokinase light chain (rEK_L) were achieved.

Thai bovine and buffalo EK_L gene amplification by RT-PCR and nested PCR produced 708 bp PCR products, which encoded 235 predicted amino acids. Only one amino acid mutation was found in the Thai bovine EK_L. The obtained protein sequence of Thai buffalo EK_L in this research was closely related to that previously reported for bovine EK_L. In the step of bovine rEK_L expression and purification, rEK_L active could be obtained from expression system using *Pichia pastoris* Y11430. The enzymatic activity was detected in the recombinant *Pichia* fermentor culture supernatant during the methanol production phase. Low temperature production did not improve the quality of rEK_L, but did increase the yield of recombinant protein. After ion exchange purification, 433 mg/L of purified rEK_L was obtained from fermentation under the low induction temperature condition. The ability of rEK_L to cleave a specific $(Asp)_4Lys$ site of rice BGlu1-thioredoxin fusion proteins showed that fusion protein was cleaved by the purified rEK_L from this research in 4 h at 30°C. The products of cleavage of the fusion protein with commercial rEK_L and rEK_L from this research showed similar patterns on SDS-PAGE.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....I

บทคัดย่อ.....II

Abstract.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญรูปภาพ.....VII

สารบัญคำย่อ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 งานวิจัยส่วนที่ 1 การโคลนยีนเอนเทอโรไคเนสสายสั้น.....10

บทที่ 3 งานวิจัยส่วนที่ 2 การแสดงออกของยีนเอนเทอโรไคเนสสายสายสั้น.....17

บทที่ 4 บทสรุป.....35

บรรณานุกรม.....37

ภาคผนวก.....41

ภาคผนวก ก Submission GenBank Accession number DQ518426.....42

ภาคผนวก ข นำเสนอผลงานด้วยวาจาในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ณ. จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549.....45

ภาคผนวก ค นำเสนอด้วยวาจาในการประชุม The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products ณ. โรงแรมโฆษะ จ. ขอนแก่น วันที่ 23-25 พฤษภาคม 2550.....52

ประวัตินักวิจัย.....64

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตและกิจกรรมจำเพาะของ rEK_L ที่ผลิตในเซลล์เจ้าบ้านชนิดต่าง ๆ.....5

2.1 ข้อมูลไพรเมอร์.....11

3.1 แสดงกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *P. pastoris* Y1143.....21

3.2 ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักแต่ละครั้ง.....26

สารบัญภาพ

รูปภาพที่ **หน้า**

2.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EK_L จากวัวในงานวิจัยนี้และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส....12

2.2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน EK_L ของวัวจากหลายแหล่ง....13

2.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EK_L จากควายในงานวิจัยนี้ (Accession number DQ518426) และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส....15

2.4 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน rEK_L จากควายในงานวิจัยนี้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ....16

3.1 แสดงการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนในน้ำหมักส่วนใสซึ่งได้จากกระบวนการหมักครั้งที่สองโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE....25

3.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (A) ปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด (B) น้ำหนักเซลล์แห้ง (C) ผลผลิตจำเพาะของ rEK_L ที่ได้จากการหมักแต่ละครั้งกับเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน....27

3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (A) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (B) กิจกรรมจำเพาะของ rEK_L และ (C) ผลผลิตของ rEK_L กับเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในกระบวนการผลิต rEK_L โดยใช้เชื้อ *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB NH8_EK_L 30

3.4 แสดงผลการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนในแต่ละส่วนที่ได้จากกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์....32

3.5 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ผลิตที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส และ rEK_L ที่ขายตามท้องตลาด....33

คำอธิบายสัญลักษณ์

AOX	Alcohol oxidase enzyme
BMGY	Buffered glycerol complex medium
cDNA	Complementary DNA
DOT	Dissolve oxygen tension
EK_L	Enterokinase light chain enzyme
GBS	Glycerol basal salt medium
GF	Glycerol feed medium
MF	Methanol feed medium
rEK_L	Recombinant enterokinase light chain
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodiumdodisyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SP column	Sulfopropyl column
$Y_{p/x}$	Specific production (unit/g cell)
$Y_{x/s}$	Biomass yield on methanol (g cell/ g methanol)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการผลิตโปรตีนโดยระบบบรีคอมบิแนนท์เป็นที่สนใจกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากการผลิตโปรตีนโดยระบบบรีคอมบิแนนท์เป็นการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมซึ่งนำยีนที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจมาตัดต่อกับดีเอนเอของจุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นเวกเตอร์ การอาศัยจุลินทรีย์หรือเซลล์ยูคาริโอตเป็นเซลล์เจ้าบ้านมีข้อได้เปรียบมากกว่าการผลิตโปรตีนซึ่งสกัดจากแหล่งธรรมชาติหรือเนื้อเยื่อดั้งเดิมคือ สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากกว่า เนื่องจากจุลินทรีย์หรือเซลล์ยูคาริโอตบางชนิดที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านมีการเจริญรวดเร็ว, สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการได้โดยควบคุมที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ ซึ่งข้อได้เปรียบดังกล่าวนี้ทำให้มีงานวิจัยในห้องปฏิบัติการเป็นจำนวนมากที่มุ่งเน้นการพัฒนาการผลิตโปรตีนโดยระบบบรีคอมบิแนนท์ให้มีคุณภาพสูงขึ้น แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการผลิตโปรตีนในระบบบรีคอมบิแนนท์คือ การนำยีนของโปรตีนที่เราสนใจ เชื่อมเข้ากับยีนที่มีการแสดงออกของโปรตีนอีกชนิดหนึ่ง หรือที่เรียกว่า ฟิวชันโปรตีน (fusion protein) ซึ่งข้อดีของการทำฟิวชันโปรตีนคือ โปรตีนที่เรานำมาทำฟิวชันโปรตีนนั้น ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกระดับสูงในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นเมื่อโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออก โปรตีนที่เราสนใจซึ่งเชื่อมต่อกับโปรตีนดังกล่าวนั้น ก็จะมีการแสดงออกที่สูงด้วย ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่เราสนใจแล้ว ยังเป็นการเพิ่มความเสถียรให้กับโปรตีนที่เราสนใจซึ่งผลิตในเซลล์เจ้าบ้านด้วย นอกจากนั้นอาจนำโปรตีนที่เราสนใจเชื่อมต่อกับฟิวชันโปรตีนบางชนิด เพื่อให้สะดวกต่อการแยกโปรตีนที่เราสนใจออกจากโปรตีนอื่น ๆ ที่ผลิตในเซลล์เจ้าบ้าน และง่ายในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แต่ปัญหาของการนำฟิวชันโปรตีนมาประยุกต์ใช้ก็คือ เมื่อมีการแสดงออกของฟิวชันโปรตีน ผลผลิตที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายจะได้โปรตีนที่เราต้องการซึ่งเชื่อมต่อกับฟิวชันโปรตีน ดังนั้นจึงต้องหาวิธีในการแยกโปรตีนที่เราไม่ต้องการออกไป ซึ่งวิธีการในการตัดโปรตีนทั้งสองออกจากกันนั้นสามารถใช้สารเคมีหรือใช้เอ็นไซม์ แต่การใช้สารเคมีนั้นมีข้อเสียคือ จะทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้เสียสภาพไป ดังนั้นจึงนิยมใช้เอ็นไซม์ในการตัดโปรตีนมากกว่าซึ่งเอ็นไซม์ที่ใช้จะเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอส เช่น ธรอมบิน (Thrombin), แฟกค์เตอร์สิบเอ (Factor Xa) และ เอนเทอโรไคเนส (enterokinase)

เนื่องจากเอนเทอโรไคเนส เป็นโปรติเอสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งตัดสูง, สามารถทำงานได้ในสภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่หลากหลายและสามารถตัดโปรตีนที่ต้องการออกจากฟิวชันโปรตีนโดยไม่เหลือกรดอะมิโนที่ไม่ต้องการอยู่เลย ดังนั้นเอนเทอโรไคเนสจึงเป็นเอ็นไซม์ที่น่าสนใจในการนำมาใช้แยกโปรตีนที่ต้องการออกจากฟิวชันโปรตีน (McCormick and Berg, n.d.)

เอนเทอโรไคเนส (EK) หรือ เอนเทอโรเปปทิเดส ค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Pavlov's laboratory เป็นเอ็นไซม์ที่สกัดได้จากลำไส้เล็กที่สามารถกระตุ้นให้เอ็นไซม์จากตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายทำงานได้ EK พบสูงที่สุดในส่วนดูโอดินัมและเริ่มลดลงเรื่อยๆในส่วนถัดไปจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบในส่วนของเจจูนั่ม (Yuan *et. al.*, 1998) EK เป็นโปรติเอสที่จัดอยู่ในจำพวกซีรีนโปรติเอสมีตำแหน่งตัดจำเพาะของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีนเป็น กรด แอสพาร์ติก (Aspartic acid) ที่เรียงต่อกัน 4 ตัว แล้วตามด้วยไลซีน (lysine) ($(Asp)_4Lys$) โดย EK จะตัดหลังตำแหน่งของไลซีนทำหน้าที่ในการเปลี่ยนทริปซิโนเจนให้กลายเป็นทริปซิน (Peng *et. al.*, 2004) โครงสร้างของ EK ที่พบในวัวมีโครงสร้างเป็นเฮทเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าทางด้านปลายอะมิโนของโปรตีน (ขนาดโมเลกุล 120 kDa) เรียกว่า สายยาว (heavy chain) ทำหน้าที่ในการจดจำสับเสรตที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น ทริปซิโนเจน (trypsinogen) สำหรับส่วนที่มีขนาดเล็กกว่าซึ่งอยู่ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ (ขนาดโมเลกุล 47 kDa) เรียกว่า สายสั้น (light chain) ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนที่ตำแหน่งซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะ (Kim *et. al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่า แม้ว่า EK จะเหลือส่วนของสายสั้นเพียงส่วนเดียว ก็สามารถเกิดคุณสมบัติในการเป็นโปรติเอสได้โดยไม่มีผลทำให้กิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์ลดลงเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับสับเสรตสังเคราะห์และสับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีนซึ่งมีบริเวณตัดของ EK (Song *et al.*, 2002) เนื่องจากพบว่าที่ส่วนของสายสั้นนี้ปรากฏบริเวณเร่งปฏิกิริยา หรือ แอคทีฟไซท์ (active site) (Gasparian *et. al.*, 2003) ด้วยเหตุนี้ทำให้ส่วนของสายสั้นจึงเป็นที่สนใจในการโคลนและนำไปผลิตเอ็นไซม์ EK ในระบบบรีคอมบิแนนท์

ในปัจจุบันพบว่าเอ็นไซม์ EK นั้นมีประโยชน์มากในการตัดฟิวชันโปรตีน เนื่องจากมีความจำเพาะต่อตำแหน่งตัดสูง, มีความสามารถทนต่อสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาได้หลากหลายคือสามารถเกิดปฏิกิริยาการตัดฟิวชันโปรตีนได้ในสภาวะพีเอชช่วงกว้าง ๆ ตั้งแต่ 4.5 ถึง 9.5 และในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส รวมทั้งสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่มีดีเทอเจนท์ (detergent) และดีเนอเจอเรนท์ (denaturant) ที่หลากหลาย (Yuan and Hua, 2002) ดังนั้น EK จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ตัดโปรตีนฟิวชัน (La Vallie *et. al.*, 1993)

EK ที่มีการผลิตขายนั้นเป็นการสกัดจากลำไส้เล็กของหมูหรือวัวซึ่งได้เอ็นไซม์ปริมาณน้อยและไม่บริสุทธิ์นัก เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเอ็นไซม์โปรติเอสชนิดอื่น ๆ (Yuan and Hua, 2002) ส่งผลให้ EK มีราคาแพงมาก แนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าว คือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยโดยการโคลนยีนที่มีการแสดงออกของ EK ตัดต่อเข้ากับดีเอนเอเวกเตอร์ จากนั้นถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแสดงออกของ EK ในเซลล์เจ้าบ้านนั้น ๆ ซึ่งเป็นการผลิต EK ในระบบบรีคอมบิแนนท์ ซึ่งวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบคือ เซลล์เจ้าบ้านที่เลือกใช้ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็น โปรคาริโอต เช่น แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ ยูคาริโอต เช่น

ยีสต์ *Pichia pastoris* ซึ่งเลี้ยงง่าย สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งสามารถควบคุมการแสดงออกของเอ็นไซม์ได้ตามต้องการ โดยการเลือกใช้โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกในระดับสูงมาควบคุมการแสดงออกของยีน EK ทำให้มีการปลดปล่อยเอ็นไซม์ EK ได้ในปริมาณมาก ในปี 1995 Laura และคณะ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาการตัดสับเสรตดั้งเดิมคือ ทริปซิโนเจนระหว่างรีคอมบิแนนท์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) และเอ็นไซม์ EK ที่ได้จากการสกัดจากลำไส้วัวโดยตรง พบว่า rEK_L มีกิจกรรมเจาะเพาะ (specific activity) ที่ต่ำกว่า EK ที่ได้จากการสกัดจากลำไส้วัวโดยตรง 30 เท่า ซึ่งเนื่องมาจาก EK ที่สกัดมาจากลำไส้วัวมีส่วนของ EK สายยาว (heavy chain) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่จับกับ ทริปซิโนเจน แต่เมื่อนำไปตัดสับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีนซึ่งมีตำแหน่งตัดของ EK พบว่า rEK_L มีกิจกรรมจำเพาะที่สูงกว่า EK ที่ได้จากการสกัดจากลำไส้วัวโดยตรง 3 เท่า (Vozza *et. al.*, 1996)

มีหลายงานวิจัยได้ศึกษาการผลิต rEK_L จากลำไส้วัวซึ่งได้ทดลองใช้เซลล์เจ้าบ้านที่หลากหลาย ในปี 1993 La Vallie และคณะ โคลน cDNA ของยีน EK_L จากลำไส้วัวในส่วนดูโอดินัม จากนั้นนำมาแสดงออกในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cell) ซึ่ง rEK_L ที่ขับออกนอกเซลล์ COS-1 มีระดับต่ำมาก และยังพบว่าเอ็นไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานั้นไม่เสถียร ซึ่งกลุ่มนักวิจัยสรุปว่า เอ็นไซม์ที่มีการแสดงออกในเซลล์ COS-1 ส่วนใหญ่นั้นไม่มีการม้วนพับ (folding) ที่ถูกต้อง จึงทำให้โครงสร้างของเอ็นไซม์ไม่เสถียรและถูกย่อยได้ง่ายเมื่อมีการปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์

ในปี 1995 Collin-Racie และคณะ ได้ผลิตเอ็นไซม์ rEK_L จากลำไส้วัวโดยเลือกใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของเอ็นไซม์ โดยได้นำยีนของ EK_L มาเชื่อมต่อกับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้าน DsbA โดยให้ยีน EK_L อยู่ทางปลายคาร์บอกซี่ของโปรตีน DsbA ซึ่งพบว่า rEK_L ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติที่ไม่แตกต่างจาก rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยของ La Vallie และคณะ ที่ผลิตเอ็นไซม์ใน COS-1 เซลล์

ในปี 2002 Yuan และคณะ โคลน cDNA ของยีน EK_L จากลำไส้วัวซึ่งให้เชื่อมกับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านคือ ไธโอรีดอกซ์ซิน (thioredoxin) และเลือก *E. coli* BL21 (DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของเอ็นไซม์ พบว่าเอ็นไซม์มีกิจกรรมจำเพาะสูงถึง 720 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม

ในปี 2004 Kim และคณะ ผลิต rEK_L จากลำไส้วัวโดยมีพอลีฮีสติดีน (His tag) เชื่อมต่อที่ปลายคาร์บอกซี่และเลือก *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมให้เกิดการแสดงออก จากผลการทดลองพบว่า ได้ปริมาณเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ 3.8 มิลลิกรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ในปี 2000 Svetina และคณะ โคลน cDNA ของยีน EK_L ให้เชื่อมต่อกับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านคือ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และเลือก *Aspergillus niger* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ (Soya milk medium) พบว่าได้ปริมาณเอ็นไซม์บริสุทธิ์ 1.9 มิลลิกรัม ในอาหาร 1 ลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์ 19,880 หน่วยต่อ 1 มิลลิกรัมของโปรตีน

ในปี 2004 Peng และคณะผลิต rEK_L จากลำไส้วัวใน *P. pastoris* โดยมีพอลิฮีสติดีน (His tag) ต่ออยู่ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ของโปรตีนเพื่อให้ง่ายต่อการแยกและทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ และใช้โปรโมเตอร์ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกได้ในระดับสูงด้วยเมธานอล คือ Alcohol oxidase promoter หรือ (AOX) โดยให้มีการผลิตเอ็นไซม์และปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์โดยใช้ α-factor (signal sequence) จาก *S. cerevisiae* จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่สามารถใช้เมธานอลได้น้อย ซึ่งทำให้เจริญได้ช้าเรียกว่า Methanol utilization slow phenotypes หรือ Mut^s และสายพันธุ์ที่สามารถใช้เมธานอลได้ปกติเรียกว่า Methanol utilization plus phenotypes หรือ Mut^+ พบว่า Mut^s จะมีความสามารถในการแสดงออกของ rEK_L มากกว่า Mut^+ และที่สภาวะในการหมักที่เหมาะสมพบว่าได้ปริมาณของ rEK_L สูงถึง 350 มิลลิกรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ได้ 1.5 มิลลิกรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรและมีกิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์ 9,000 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัมซึ่งต่ำกว่าเมื่อผลิตใน *A. niger* ซึ่งคณะนักวิจัยได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการเกิดกระบวนการไกลคอสิเลชัน (glycosylation) ซึ่งมีรูปแบบที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งจะมีผลต่อกิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์

จากงานวิจัยหลายชิ้นที่ศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ rEK_L ที่ผลิตโดยใช้เซลล์เจ้าบ้านที่หลากหลายดังกล่าว เมื่อสรุปเปรียบเทียบปริมาณเอ็นไซม์ที่ได้รวมทั้งกิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 1

จากผลการเปรียบเทียบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *P. pastoris* เหมาะสมที่จะใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต rEK_L แม้ว่า rEK_L ที่ผลิตจาก *P. pastoris* จะมีกิจกรรมจำเพาะที่ต่ำกว่าเมื่อผลิตโดยใช้ *A. niger* แต่อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จะเห็นว่าผลผลิตของ rEK_L ที่ได้จากการผลิตโดยใช้ *P. pastoris* จะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. niger* รวมทั้งในการเลี้ยง *A. niger* จะมีความยุ่งยากกว่าการเลี้ยงยีสต์อีกด้วย

ตารางที่1.1 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตและกิจกรรมจำเพาะของ rEK_L ที่ผลิตในเซลล์เจ้าบ้านชนิดต่าง ๆ

เซลล์เจ้าบ้าน	ความเข้มข้นสุดท้ายของ rEK_L (มิลลิกรัมของเอ็นไซม์ ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วย ต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม)
A. niger Svetina และคณะ, 2000	5	19,880
E. coli Yuan และคณะ, 2002	268	720
S. cerevisiae Kim.และคณะ, 2004	3.8	-
P. pastoris Peng และคณะ, 2004	350	9000

สำหรับ *P. pastoris* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ซึ่งเรียกว่า methylotrophic yeast ต่อมาได้มีการใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจาก *P. pastoris* เป็นยูคาริโอตซึ่งมีกระบวนการเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสังเคราะห์โปรตีน (post-translation modification) ซึ่งไม่มีในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอต ดังนั้น *P. pastoris* จึงเหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มาจากยูคาริโอต ซึ่งโปรตีนบางชนิดจำเป็นต้องมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อให้โปรตีนที่ผลิตขึ้นสามารถทำงานได้ (Lin Cereghino and Cregg, 2000) นอกจากนั้นโปรโมตอร์ที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของ *P. pastoris* คือ AOX promoter ซึ่งมีความสำคัญในการย่อยสลายเมธานอล โปรโมเตอร์ดังกล่าวสามารถถูกควบคุมให้มีการแสดงออกได้ในระดับสูงโดยการเหนี่ยวนำด้วยเมธานอล และเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงมาก (Inan *et. al.*, 2001) ดังนั้น *P. pastoris* จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต rEK_L มากที่สุด

สำหรับในประเทศไทย rEK_L ที่ใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนยังเป็นเอ็นไซม์ที่สั่งนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูงถึง $336 หรือ 13,776 บาท ต่อ 0.32 ไมโครกรัมจาก New England biolabs (http://www.neb.com) ดังนั้นเพื่อลดการนำเข้าของ rEK_L จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ประเทศไทยจะต้องมีการผลิต rEK_L ขึ้นใช้เอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการผลิต rEK_L โดยการโคลนยีนที่มีการแสดงออกของยีน EK_L จากลำไส้วัว และนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมคือ *P. pastoris* เพื่อให้ rEK_L ที่ผลิตขึ้นมีปริมาณมากและมีคุณภาพสูง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัย

จำเป็นต้องโคลนยีน EK_L จากลำไส้วัวเอง เนื่องจากได้พยายามติดต่อผู้วิจัยที่เคยทำงานนี้มาก่อนแล้ว (Yuan and Hua, 2002) แต่ไม่ได้รับการตอบกลับ หรือบางท่านไม่ยินดีที่จะมอบโคลนให้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องโคลนยีน EK_L เองโดยจะคัดเลือกโคลนมาจากลำไส้ส่วนดูโอดินัมของวัวในประเทศไทย นอกจากนี้ ในงานวิจัยส่วนของการโคลนยีน EK_L เนื่องจากสปีชีส์ของวัวและควายมีความใกล้เคียงกันมาก และข้อมูลของยีน EK_L จากควายยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงโคลนยีน EK_L จากควายในประเทศไทยด้วย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปสู่การผลิต rEK_L จากควายในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

หากงานวิจัยนี้สำเร็จจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยทางด้านการผลิตโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์ในประเทศไทย เนื่องจากเป็นการลดต้นทุนการทำวิจัยโดยลดค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการนำเข้าเอ็นไซม์ rEK_L จากต่างประเทศ จึงถือเป็นการพัฒนางานวิจัยในประเทศไทยให้ได้ทัดเทียมประเทศอื่น ๆ งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาขีดความสามารถของนักวิจัยเพื่อผลิตนักวิจัยที่มีความรู้ความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ในระบบรีคอมบิแนนท์ ซึ่งความรู้และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่ได้จะเป็นพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอ็นไซม์หรือโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์อื่น ๆ ต่อไป ซึ่งจะเป็นการลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ และเป็นการพัฒนาประเทศด้วยความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อนำไปสู่การมีเทคโนโลยีเป็นของตนเองในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1. โคลนยีนที่มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ EK_L จากลำไส้วัวและควายในประเทศไทย

1.2.2. ชักนำให้เกิดการแสดงออกของ rEK_L จากวัวใน *P. pastoris*

1.2.3. ผลิต rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตรเพื่อเพิ่มปริมาณ

1.2.4. แยก rEK_L ที่ผลิตได้และทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติในการตัดสับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ทำการโคลนยีน EK_L จากลำไส้วัวและควายในประเทศไทย แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน EK_L จากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ใน GenBank จากนั้นนำยีน EK_L ที่โคลนได้จากวัวมาตัดต่อกับดีเอนเอเวคเตอร์ (DNA vector) แล้วนำไปใส่ในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมคือ *P. pastoris* Y11430 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน EK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำให้ได้ rEK_L ในปริมาณมาก แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งจะได้เอ็นไซม์ที่มีคุณภาพสูงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

1.4.1. การโคลนยีน EK_L

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากลำไส้วัวและดวายส่วนดูโอดินั่มไปทำ RT-PCR แล้วทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน EK_L เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอนเอ จากนั้นตัดต่อชิ้นดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (Promega) แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันว่าชิ้นดีเอนเอที่แทรกอยู่เป็นยีน EK_L จริง

1.4.2. การแสดงออกของยีน EK_L

แทรกชิ้นยีน EK_L จากลำไส้วัวเข้าสู่พลาสมิดที่จะใช้ในการแสดงออก (expression vector) ในทิศทางและมีการอ่านลำดับ (reading frame) ที่ถูกต้อง และถ่ายเข้าสู่ *P. pastoris* โดยอิเล็กโตรพอเรชัน (electrophoration) จากนั้นจึงทดสอบระดับการแสดงออกของยีน EK_L โดยการกระตุ้นด้วยเมธานอลในระดับฟลาสก์เขย่า

1.4.3 การผลิตเอ็นไซม์ rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การเลี้ยง *P. pastoris* จะแบ่งเป็นสี่ช่วงคือ ช่วงแรกเป็นการเลี้ยงแบบกะ ด้วยกลีเซอรอลและเมื่อกลีเซอรอลถูกใช้จนหมด จะเริ่มช่วงที่สองซึ่งเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งกะโดยการเติม 50% กลีเซอรอล ลงในถังหมักเป็นเวลา 3.85 ชั่วโมง ช่วงที่สามเป็นช่วงเหนี่ยวนำให้เชื้อมีการสร้างและปลดปล่อยเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเมธานอล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ช่วงที่สี่ คือช่วงการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการเติมเมธานอลลงในถังหมัก จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักซึ่งใช้เวลาในการเหนี่ยวนำทั้งสิ้นประมาณ 80-90 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวรีคอมบิแนนท์เอ็นไซม์ในน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของเอ็นไซม์

1.4.4 การทดสอบคุณสมบัติของเอ็นไซม์

- นำ rEK_L ที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์มวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE
- การหาความเข้มข้นโปรตีนได้ทำการวิเคราะห์โดย Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Merk)
- การทดสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ใช้สับเสรตฟลูออเรสเซนส์คือ $Gly(Asp)_4Lys$-β-Napthylamide
- ทดสอบความสามารถในการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ฟิวชันโปรตีนที่เชื่อมต่อกันด้วยตำแหน่งตัดของ EK_L [$(Asp)_4Lys$] ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการตัดสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ SDS-PAGE

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในเชิงความรู้พื้นฐานและการใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น เชิงนโยบาย เชิงสาธารณะ และการพัฒนาสู่เชิงพาณิชย์

1.5.1.สามารถโคลนยีน EK_L จากลำไส้วัวและควายในเมืองไทยได้

1.5.2.โคลนของยีน rEK_L จากวัว สามารถแสดงออกใน *P. pastoris* ได้

1.5.3.สามารถผลิต rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตรได้ เพื่อให้ได้ rEK_L และเพื่อเป็นพื้นฐานการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอื่น ๆ ต่อไป

1.5.4.สามารถผลิต rEK_L ที่มีคุณภาพสูงขึ้นในประเทศไทย เพื่อลดการนำเข้าของเอ็นไซม์ที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ ช่วยลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ

1.5.6.สามารถนำเทคนิคและความรู้พื้นฐานทางด้านการผลิตเอ็นไซม์โดยระบบรีคอมบิแนนท์ในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับการผลิตเอ็นไซม์และการผลิตโปรตีนชนิดอื่น ๆ ดังนั้นจึงเป็นการพัฒนาความรู้ความสามารถของนักวิจัยในประเทศไทยให้สูงขึ้น นำไปสู่การมีเทคโนโลยีเป็นของตนเองในอนาคต

บทที่ 2
งานวิจัยส่วนที่ 1
การโคลนยีนเอนเทอโรไคเนสสายสั้น

การทดลองนี้ ได้โคลนยีนเอนเทอโรไคเนสสายสั้น (EK_L) จากลำไส้วัวและควายในประเทศไทย แล้วนำผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของวัวสายพันธุ์อื่น ๆ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีก 4 ชนิด สำหรับ EK_L จากควายเป็นงานใหม่ที่ไม่เคยมีผู้ใดทำมาก่อน จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EK_L ของควายเข้าบันทึกในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้เป็นสาธารณะประโยชน์ต่อไป

2.1 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1.1วัสดุอุปกรณ์

พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนคือ pGEM-T easy จากบริษัท Promega ลำไส้วัวและควายส่วนดูโอดินั่มสดจากโรงฆ่าสัตว์ ชุด kit สกัดอาร์เอนเอคือ Nucleospin RNA extraction kit จากบริษัท Invitrogen เอ็นไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในการโคลนยีนจากบริษัท NEB

2.1.2 ออกแบบไพรเมอร์

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EK_L จากวัวใน GenBank (NCBI) ถูกใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_Lจากวัว เนื่องจากสปีชีส์ของวัวและควายมีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L จากควายจึงใช้ไพร์เมอร์เดียวกับไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอจากยีน EK_L จากวัว

2.1.3 สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA)

นำลำไส้วัวและควายส่วนดูโอดินัมสดจากโรงฆ่าสัตว์ซึ่งแช่เย็นตลอดเวลามาชั่ง ชั่งเนื้อเยื่อดังกล่าวประมาณ 30 มิลลิกรัม แล้วนำมาบดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัด Total RNA โดยใช้ Nucleospin RNA extraction kit เก็บ total RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.1.4 การโคลนยีน EK_L

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากวัวและควายไปทำ Reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ Q_T (ตารางที่ 2.1) ซึ่งจะใช้ mRNA เป็นแม่แบบ ทำให้ได้ cDNA จากนั้นทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ EK_L_1 และ Q_o (ตารางที่ 2.1) ตามด้วยการทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีน EK_L เพื่อเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนของยีน EK_L คือ EK_L_2 และ EK_L_3 (ตารางที่ 2.1) จากนั้นตัดต่อชิ้นดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L ที่ได้จากวัวหรือควายเข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (จาก Promega) ซึ่งเป็นโคลนนิ่งเวคเตอร์หรือพลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีน จากนั้น

ถ่ายเข้าสู่ (transformation) เซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และทำการคัดเลือก *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอนเอของยีน EK_L แทรกอยู่ และนำพลาสมิดนี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพื่อยืนยันว่าชิ้นดีเอนเอที่แทรกอยู่เป็นยีน EK_L จริง โดยการเปรียบเทียบผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลใน GenBank

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Q_T	5' CCAgTgAgCAgAgTgACgAggACTCgAgCTCAAgC$(T)_{17}$ 3'
Q_o	5'CCAgTgAgCAgAgTgACg 3'
EK_L_1	5'gATgTgTgTCAgCTgCTggg 3'
EK_L_2	5' gggAATTCAgATTgTCggAggAAgTgACTC 3'
EK_L_3	5' ggCCgCggATgTAgAAAACTTTgTATCCAC 3'

2.2 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

2.2.1. ผลการโคลนยีน EK_L จากวัว

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L จากลำไส้วัวส่วนดูโอดินั่มโดยเทคนิค RT-PCR และ nested PCR พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส เมื่อทำการโคลนชิ้น PCR เข้าสู่ pGEM-T easy แล้วทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 708 คู่เบส และสามารถทำนายลำดับกรดอะมิโนได้ 235 กรดอะมิโน (รูปที่ 2.1) จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้กับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกับโปรตีน EK_L จากวัวใน GenBank ถึง 99% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L ที่โคลนได้จากวัวในงานวิจัยนี้กับวัวใน GenBank accession number L19663 พบว่ามีความแตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่งคือ กลูตามีนตำแหน่งที่ 158 (glutamine, CAA) จากวัวใน GenBank accession number L19663 เปลี่ยนแปลงเป็น อาร์จีนีน (argennine, CGA) ซึ่งพบในวัวจากงานวิจัยนี้ (รูปที่ 2.2) ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดจากกระบวนการ RT-PCR และ nested PCR ในระหว่างการโคลนยีน

```
DNA: ATTGTCGGAGGAAGTGACTCCAGAGAAGGAGCCTGGCCTTGGGTCGTTGCT  51
 +1: I  V  G  G  S  D  S  R  E  G  A  W  P  W  V  V  A    17

DNA: CTGTATTTCGACGATCAACAGGTCTGCGGAGCTTCTCTGGTGAGCAGGGAT 102
 +1: L  Y  F  D  D  Q  Q  V  C  G  A  S  L  V  S  R  D    34

DNA: TGGCTGGTGTCGGCCGCCCACTGCGTGTACGGGAGAAATATGGAGCCGTCT 153
 +1: W  L  V  S  A  A  H  C  V  Y  G  R  N  M  E  P  S    51

DNA: AAGTGGAAAGCAGTGCTAGGCCTGCATATGGCATCAAATCTGACTTCTCCT 204
 +1: K  W  K  A  V  L  G  L  H  M  A  S  N  L  T  S  P    68

DNA: CAGATAGAAACTAGGTTGATTGACCAAATTGTCATAAACCCACACTACAAT 255
 +1: Q  I  E  T  R  L  I  D  Q  I  V  I  N  P  H  Y  N    85

DNA: AAACGGAGAAAGAACAATGACATTGCCATGATGCATCTTGAAATGAAAGTG 306
 +1: K  R  R  K  N  N  D  I  A  M  M  H  L  E  M  K  V   102

DNA: AACTACACAGATTATATACAGCCTATTTGTTTACCAGAAGAAAATCAAGTT 357
 +1: N  Y  T  D  Y  I  Q  P  I  C  L  P  E  E  N  Q  V   119

DNA: TTTCCCCCAGGAAGAATTTGTTCTATTGCTGGCTGGGGGGCACTTATATAT 408
 +1: F  P  P  G  R  I  C  S  I  A  G  W  G  A  L  I  Y   136

DNA: CAAGGTTCTACTGCAGACGTACTGCAAGAAGCCGACGTTCCCCTTCTATCA 459
 +1: Q  G  S  T  A  D  V  L  Q  E  A  D  V  P  L  L  S   153

DNA: AATGAGAAATGTCGACAACAGATGCCAGAATATAACATTACAGAAAATATG 510
 +1: N  E  K  C  R  Q  Q  M  P  E  Y  N  I  T  E  N  M   170

DNA: GTGTGTGCAGGCTACGAAGCAGGAGGGGTAGATTCTTGTCAGGGGGATTCA 561
 +1: V  C  A  G  Y  E  A  G  G  V  D  S  C  Q  G  D  S   187

DNA: GGCGGACCACTCATGTGCCAAGAAAACAACAGATGGCTCCTGGCTGGCGTG 612
 +1: G  G  P  L  M  C  Q  E  N  N  R  W  L  L  A  G  V   204

DNA: ACGTCATTTGGATATCAATGTGCACTGCCTAATCGCCCAGGGGTGTATGCC 663
 +1: T  S  F  G  Y  Q  C  A  L  P  N  R  P  G  V  Y  A   221

DNA: CGGGTGCCAAGGTTCACAGAGTGGATACAAAGTTTTCTACATTAG       708
 +1: R  V  P  R  F  T  E  W  I  Q  S  F  L  H  *         235
```

รูปที่ 2.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EK_L จากวัวในงานวิจัยนี้ ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส (Translation) แสดงอยู่ที่ด้านล่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งของซีสเตอีน (cystrtine) ที่แสดงในกล่องข้อความทั้ง 9 ตำแหน่งเป็นตำแหน่งที่คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในโมเลกุล ตำแหน่งของแอสพาราจีน (Asparagines) ที่ถูกขีดเส้นใต้ทั้ง 3 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่คาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดไกลคอสิเลชั่น (N-glycosylation) ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ถูกเน้นด้วยสีเทาทั้ง 3 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งของบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของโมเลกุล EK_L

จากรูปที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่า ลำดับกรดอะมิโนของ EK_L จากวัวมีความคล้ายคลึงกันมากในแต่ละแหล่ง โดยเฉพาะตำแหน่งที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของโมเลกุล (ฮีสติดีน 41, กรด แอสพาร์ติก 92 และซีรีน 187)

```
Thai_cow                    IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEP 50
AAB40026_Kitamoto_          IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEP 50
AAA16035_LaVallie_E.R._     IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEP 50
AAT84164_Tan_H.D._          IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEP 50
                            **************************************.********* 

Thai_cow                    SKWKAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKNNDIAMMHLEM 100
AAB40026_Kitamoto_          SKWKAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKNNDIAMMHLEM 100
AAA16035_LaVallie_E.R._     SKWKAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKNNDIAMMHLEM 100
AAT84164_Tan_H.D._          SKWKAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINRHYNKRRKNNDIAMMHLEM 100
                            ******************************* ********.******** 

Thai_cow                    KVNYTDYIQPICLPEENQVFPPGRICSIAGWGALIYQGSTADVLQEADVP 150
AAB40026_Kitamoto_          KVNYTDYIQPICLPEENQVFPPGRICSIAGWGALIYQGSTADVLQEADVP 150
AAA16035_LaVallie_E.R._     KVNYTDYIQPICLPEENQVFPPGRICSIAGWGALIYQGSTADVLQEADVP 150
AAT84164_Tan_H.D._          KVNYTDYIQPICLPEENQVFPPGRICSIAGWGALIYQGSTADVLQEADVP 150
                            ************************************************ 

Thai_cow                    LLSNEKCRQQMPEYNITENMVCAGYEAGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWL 200
AAB40026_Kitamoto_          LLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGYEAGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWL 200
AAA16035_LaVallie_E.R._     LLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGYEAGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWL 200
AAT84164_Tan_H.D._          LLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGYDAGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWL 200
                            *******:****************:**********.************** 

Thai_cow                    LAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
AAB40026_Kitamoto_          LAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
AAA16035_LaVallie_E.R._     LAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
AAT84164_Tan_H.D._          LAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
                            ********************************** 
```

รูปที่ 2.2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน EK_L ของวัวจากหลายแหล่ง โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากวัวในประเทศไทยกับข้อมูลของโปรตีน EK_L จาก GenBank ที่มี Accession number เป็น AAB40026, AAA16035 และ AAT84164 ซึ่งเป็นข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L ได้จากการโคลนโดย Kitamoto และคณะ LaVallie และคณะ และ Tan และคณะ ตามลำดับ กรดอะมิโนซึ่งที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของโมเลกุล EK_L ได้แก่ ฮิสติดีน, กรด แอสพาร์ติก และ ซีรีน แสดงโดยใช้ตัวหนา

2.2.2. ผลการโคลนยีน EK_L จากควาย

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L จากควายพบว่า ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส ซึ่งมีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอของยีน EK_L จากวัว เมื่อทำการโคลนชิ้น PCR เข้าสู่ pGEM-T easy แล้วทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า สามารถอ่านลำดับเบสได้ 708 คู่เบส จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ สามารถทำนายลำดับกรดอะมิโนได้ 235 กรดอะมิโน (รูปที่ 2.3)

```
DNA: ATTGTCGGAGGAAGTGACTCCAAAGAAGGAGCCTGGCCTTGGGTCGTTGCT 51
 +1: I  V  G  G  S  D  S  K  E  G  A  W  P  W  V  V  A   17

DNA: CTGTATTTCGACGATCAACAGGTCTGCGGAGCTTCTCTGGTGATCAGGGAT 102
 +1: L  Y  F  D  D  Q  Q  V  C  G  A  S  L  V  I  R  D   34

DNA: TGGCTGGTGTCGGCCGCCCACTGCGTGTACGGGAGAAATATGGAGCCGTCT 153
 +1: W  L  V  S  A  A  H  C  V  Y  G  R  N  M  E  P  S   51

DNA: AAGTGGAAAGCAGTGCTAGGCCTGCATATGGCATCAAATCTGACTTCTCCT 204
 +1: K  W  K  A  V  L  G  L  H  M  A  S  N  L  T  S  P   68

DNA: CAGATAGAAACTAGGTTGATTGACCAAATTGTCATAAACCCACACTACAAT 255
 +1: Q  I  E  T  R  L  I  D  Q  I  V  I  N  P  H  Y  N   85

DNA: AAACGGAGAAAGGACAATGACATCGCCATGATGCATCTTGAAATGAAAGTG 306
 +1: K  R  R  K  D  N  D  I  A  M  M  H  L  E  M  K  V  102

DNA: AACTACACAGATTATATACAGCCTATTTGTTTACCAGAAGAAAATCAAGTT 357
 +1: N  Y  T  D  Y  I  Q  P  I  C  L  P  E  E  N  Q  V  119

DNA: TTTTCCCCAGGAAGAATTTGTTCTATTGCTGGCTGGGGGACACTTATATAT 408
 +1: F  S  P  G  R  I  C  S  I  A  G  W  G  T  L  I  Y  136

DNA: CAAGGTTCTACTGCAGACGTACTGCAAGAAGCTGACGTTCCCCTTCTATCA 459
 +1: Q  G  S  T  A  D  V  L  Q  E  A  D  V  P  L  L  S  153

DNA: AATGAGAAATGTCAACAACAGATGCCAGAATATAACATTACGGAAAATATG 510
 +1: N  E  K  C  Q  Q  Q  M  P  E  Y  N  I  T  E  N  M  170

DNA: GTGTGTGCAGGCTACGAAGCAGGAGGGGTAGATTCTTGTCAGGGGGATTCA 561
 +1: V  C  A  G  Y  E  A  G  G  V  D  S  C  Q  G  D  S  187

DNA: GGCGGACCACTCATGTGCCAAGAAAACAACAGATGGCTCCTGGCTGGCGTG 602
 +1: G  G  P  L  M  C  Q  E  N  N  R  W  L  L  A  G  V  204

DNA: ACGTCATTTGGATATAAGTGTGCACTGCCTAATCGCCCAGGGGTGTATGCC 663
 +1: T  S  F  G  Y  K  C  A  L  P  N  R  P  G  V  Y  A  221

DNA: CGGGTCCCAAGGTTCACAGAGTGGATACAAAGTTTTCTACATTAG       708
 +1: R  V  P  R  F  T  E  W  I  Q  S  F  L  H  *       235
```

รูปที่ 2.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน EK_L จากควายในงานวิจัยนี้ (Accession number DQ518426) ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส (Translation) แสดงอยู่ที่ด้านล่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งของซีสเตอีน (cystrtine) ที่แสดงในกล่องข้อความทั้ง 9 ตำแหน่งเป็นตำแหน่งที่คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในโมเลกุล ตำแหน่งของแอสพาราจีน (Asparagines) ที่ถูกขีดเส้นใต้ทั้ง 3 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดไกลคอสิเลชั่น (N-glycosylation) ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ถูกเน้นด้วยสีเทาทั้ง 3 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งของบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของโมเลกุล EK_L

หลังจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากควายที่ได้ในงานวิจัยนี้และโปรตีน EK_L จากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนเกือบทั้งหมดของโปรตีน EK_L จากควายมีความใกล้เคียงกับวัวใน GenBank (Accession number L19663) มากถึง 98% และใกล้เคียงกับหมู 89% ลิงชิมแพนซีส์ 85% คน 85% และหนู 81% (รูปที่ 2.4) จากผลดังกล่าว

สามารถสรุปได้ว่าลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ EK_L ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะส่วนของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของโมเลกุล

เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนยีน EK_L จากควายที่ได้จากงานวิจัยนี้นับเป็นงานวิจัยแรก ดังนั้นข้อมูลที่ได้นี้จึงได้รับการบันทึกไว้ใน GenBank โดยมี Accession number DQ518426 ซึ่งเผยแพร่ใน NCBI (ภาคผนวก ก)

```
Human          IVGGSNAKEGAWPWVVGLYYGGR----LLCGASLVSSDWLVSAAHCVYGRNLEPSKWTAI 56
Chimpanzee     IVGGSNAKEGAWPWVVGLYYGGR----LLCGASLVSSDWLVSAAHCVYGRNLEPSKWTAI 56
Cow            IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQ----QVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEPSKWKAV 56
Thai_cow       IVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQ----QVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEPSKWKAV 56
Thai_Buffalo   IVGGSDSKEGAWPWVVALYFDDQ----QVCGASLVIRDWLVSAAHCVYGRNMEPSKWKAV 56
Pig            IVGGNDSREGAWPWVVALYYNGQ----LLCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNLEPSKWKAI 56
Rat            IVGGSDTQAGAWPWVVALYYRDRSGDRLLCGASLVSSDWLVSAAHCVYRRNLDPTRWTAV 60
               ****.::: *******.**: .:     :******  ************ **::*::*.*:

Human          LGLHMKSNLTSPQTVPRLIDEIVINPHYNRRRKDNDIAMMHLEFKVNYTDYIQPICLPEE 116
Chimpanzee     LGLHMKSNLTSPQTVPRLIDEIVINPHYNRRRKDNDIAMMHLEFKVNYTDYIQPICLPEE 116
Cow            LGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINRHYNKRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPICLPEE 116
Thai_cow       LGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPICLPEE 116
Thai_Buffalo   LGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKDNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPICLPEE 116
Pig            LGLHMTSNLTSPQIVTRLIDEIVINPHYNRRRKDSDIAMMHLEFKVNYTDYIQPICLPEE 116
Rat            LGLHMQSNLTSPQVVRRVVDRIVINPHYDKRRKVNDIAMIHLEFKVNYTDYIQPICLPEE 120
               ***** *******   *::*.**** **::*** .*****:***:*****************

Human          NQVFPPGRNCSIAGWGTVVYQGTTANILQEADVPLLSNERCQQQMPEYNITENMICAGYE 176
Chimpanzee     NQVFPPGRNCSIAGWGTVVYQGTTANILQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMICAGYE 176
Cow            NQVFPPGRICSIAGWGALIYQGSTADVLQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGYD 176
Thai_cow       NQVFPPGRICSIAGWGALIYQGSTADVLQEADVPLLSNEKCRQQMPEYNITENMVCAGYE 176
Thai_Buffalo   NQVFSPGRICSIAGWGTLIYQGSTADVLQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMVCAGYE 176
Pig            NQVFPPGRICSIAGWGKVIYQGSPADILQEADVPLLSNEKCQQQMPEYNITENMMCAGYE 176
Rat            NQTFTPGRMCSIAGWGYNKINGSTVDVLKEADVPLVSNEKCQQQLPEYDITESMLCAGYE 180
               **.*.*** *******    :*:..::*:******:***:*:**:***:***.*:****:

Human          EGGIDSCQGDSGGPLMCQENNRWFLAGVTSFGYKCALPNRPGVYARVSRFTEWIQSFLH 235
Chimpanzee     EGGIDSCQGDSGGPLMCQENNRWFLAGVTSFGYKCALPNRPGVYARVSRFTEWIQSFLH 235
Cow            AGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
Thai_cow       AGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
Thai_Buffalo   AGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWLLAGVTSFGYKCALPNRPGVYARVPRFTEWIQSFLH 235
Pig            EGGIDSCQGDSGGPLMCLENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPKFTEWIQSFLH 235
Rat            EGGTDSCQGDSGGPLMCQENNRWFLVGVTSFGVQCALPNHPGVYARVSQFIEWIHSFLH 239
                ** ******************* *****:*.****** :*****:*******.:* ***:****
```

รูปที่.2.4 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากควายในงานวิจัยนี้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ได้แก่ วัว, ลิงชิมแฟนซีส์, คน, หมู และ หนู ใน GenBank. กรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาของโมเลกุลเอ็นไซม์ได้แก่ ฮีสติดีน กรดแอสพาร์ติก และ ซีรีน แสดงโดยใช้ตัวหนา

2.3 บทสรุป

สรุปโดยรวมแล้ว เนื่องจากโคลน EK_L ที่ได้จากวัวในงานวิจัยส่วนนี้มีความเหมือนกับ EK_L ในงานวิจัยอื่น และมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของโมเลกุล ดังนั้นโคลนของ EK_L ที่ได้จากวัวในส่วนนี้จะถูกนำไปชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน EK_L ต่อไปในงานวิจัยส่วนที่ 2

2.4 การเผยแพร่ผลงานจากงานวิจัยส่วนนี้

2.4.1 เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EK_L ของควายในฐานข้อมูล NCBI (ภาคผนวก ก)

2.4.2 นำเสนอข้อมูลงานวิจัย ณ. งานประชุม เสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ณ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 13-14 ตุลาคม 2549 (ภาคผนวก ข)

บทที่ 3

งานวิจัยส่วนที่ 2

การแสดงออกของยีน EK_L

3.1. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

ยีสต์ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกคือ *P. pastoris* Y11430 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมและสามารถใช้เมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ในอัตราปกติ (Mut^+) พลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกคือ pPICZαB Thrombin ซึ่งมีฮิสติดีน 6 โมเลกุลอยู่ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ (C-terminal) และ pPICZαB NH8 ซึ่งมีฮีสติดีน 8 โมเลกุลอยู่ด้านปลายอะมิโน (N-terminal) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

เอ็นไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกซึ่งมีส่วนของยีน EK_L แทรกอยู่ ซื้อจากบริษัท NEB สารลดการเกิดฟอง (antifoam) ซื้อจากบริษัท Fluka สับเสรตที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ (enzymatic activity) ใช้สับเสรตฟลูออเรสเซนส์คือ Gly-$(Asp)_4$-Lys-β-Naphthylamide ซื้อจากบริษัท Sigma

3.1.2 การแสดงออกของยีน EK_L

พลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกคือ pPICZαB Thrombin และ pPICZαB NH8 ซึ่งมีแอลฟาแฟคเตอร์ (α factor) ซึ่งเป็นสัญญาณในการปลดปล่อยเอ็นไซม์ rEK_L ออกนอกเซลล์ และมีโปรโมเตอร์ AOX1 ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยเมธานอล ทำการแทรกชิ้นยีน EK_L เข้าสู่พลาสมิดที่จะใช้ในการแสดงออก (expression vector) ในทิศทางและมีการอ่านลำดับ (reading frame) ที่ถูกต้องโดยเพิ่มจำนวนดีเอนเอที่เป็นส่วนของชิ้นยีน EK_L จากพลาสมิดที่ใช้ในการโคลน (pGEM-T easy) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ *Eco*RI และ *Sac*II คือไพรเมอร์ EK_L_2 และ EK_L_3 (ตารางที่ 2.1) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pPICZαB Thrombin หรือ pPICZαB NH8 ที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Sac*II จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องโดยเฉพาะส่วนรอยต่อของชิ้นยีนและพลาสมิด จากนั้นตัดพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอนเอแทรกอยู่ในทิศทางและการอ่านลำดับที่ถูกต้องให้เป็นเส้นตรงด้วยเอ็นไซม์ *Sac*I แล้วถ่ายเข้าสู่ *P. pastoris* Y11430 โดยอิเล็กโตรพอเรชัน

(electrophoration) ตามวิธีการที่แนะนำโดย Invitogen (Invitrogen, n.d.) เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดและสามารถเจริญได้บนอาหาร YPD-zeocin (Yeast extract 10 กรัมต่อลิตร Peptone 20 กรัมต่อลิตร Dextrose 20 กรัมต่อลิตร และ Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะถูกตรวจสอบเพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดแทรกเข้าไปในจีโนมยีสต์จริง โดยใช้เทคนิค colony PCR โคโลนีที่ให้ผลเป็นบวกจะถูกนำมาทดสอบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอ็นไซม์ในระดับฟลาสก์เขย่าและเปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีน EK_L แทรกอยู่ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม โดยเลี้ยง *P. pastoris* ในอาหาร BMGY (Charoenrat *et al.*, 2005) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกโดยการเติมเมธานอล ทุก ๆ 12 ชั่วโมงให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเมธานอลเป็น 1-3% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทดสอบความสามารถในการแสดงออกของยีน EK_L ในระดับ mRNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน EK_L สำหรับโคลนที่มีการแสดงออกของยีน EK_L จะถูกคัดเลือกและนำไปใช้ในการผลิต rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.1.3 การผลิตเอ็นไซม์ rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การเตรียมกล้าเชื้อ (Starter culture) เริ่มจากการเลี้ยงโคลนที่ได้รับการคัดเลือกในอาหาร BMGY ปริมาตร 70 มิลลิลิตร สภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้กล้าเชื้อ 5% หรือ 50 มิลลิลิตรเติมลงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีอาหาร Glycerol Basal Salt (GBS) (Charoenrat *et al.*, 2005) ที่ปลอดเชื้ออยู่ 950 มิลลิลิตร

วิธีการในการผลิตโปรตีนโดยระบบรีคอมบิแนนท์โดย *P. pastoris* ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้จะแบ่งเป็น 4 ช่วง (Charoenrat *et al.*, 2005) คือ

3.1.3.1. Glycerol Batch phase: เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบกะโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ในระหว่างขั้นตอนนี้ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (DOT) จะลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเซลล์จะใช้ออกซิเจนในการเมทาบอลิซึม กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อเชื้อยีสต์ใช้กลีเซอรอลหมด สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของค่า DOT ขั้นตอนนี้จะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นกระบวนการเพาะเลี้ยงจะเข้าสู่ช่วงที่สองคือการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะโดยใช้อาหารที่เป็นกลีเซอรอล (Glycerol fed-batch phase)

3.1.3.2. Glycerol fed-batch phase: เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหาร ในระหว่างกระบวนนี้ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 40 กรัมต่อลิตร

เท่ากับ Charoenrat และคณะที่ได้รายงานไว้ในปี 2005 ปริมาณอาหาร Glycerol feed medium (GF) ทั้งหมดที่เติมลงในถังหมักคือ 63.37 กรัมต่อปริมาตรอาหารหมักเริ่มต้น 1 ลิตร ในเวลา 3.85 ชั่วโมง หรือ 16.46 กรัมต่อชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้ น้ำหนักเซลล์แห้งจะมีความเข้มข้นประมาณ 40 กรัมต่อลิตรตามต้องการ จากนั้นกระบวนการเพาะเลี้ยงจะเข้าสู่ช่วงที่สามคือ ช่วงเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน EK_L โดยใช้เมธานอล (Methanol induction phase)

3.1.3.3. Methanol induction phase: เป็นกระบวนการกระตุ้นการผลิตโปรตีนโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะซึ่งจะมีการเติม Methanol feed medium (MF) (Charoenrat *et al.*, 2005) เข้าสู่ถังหมักให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ต่ำมากคือ 0.633 มิลลิลิตรต่ออาหารหมักเริ่มต้น 1 ลิตร เพื่อให้เชื้อมีเวลาในการปรับตัวที่จะใช้เมธานอลเป็นสารกระตุ้น, เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นแหล่งพลังงาน กระบวนการเหนี่ยวนำเริ่มโดยการฉีดเมธานอลเข้าสู่ถังหมักนี้จะฉีดเมื่อเชื้อใช้เมธานอลหมดซึ่งสังเกตได้จากค่า DOT ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน EK_L ในช่วงนี้จะฉีดเมธานอลซ้ำๆกันในทันทีที่เชื้อใช้เมธานอลหมดซึ่งทำทั้งหมด 5 ครั้ง ระยะเวลาในช่วงนี้ประมาณ 3 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดกระบวนการในขั้นนี้ เชื้อจะสามารถปรับตัวใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ จากนั้นกระบวนการหมักแบบกึ่งกะโดยมีการเติม MF เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจะเริ่มขึ้น (Methanol production phase)

3.1.3.4. Methanol production phase: เป็นกระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์ ในขั้นตอนนี้จะมีการปรับอัตราการเติมเมธานอลให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเท่านั้น แต่ไม่ให้มากเกินไปจนเกิดสภาวะที่เป็นพิษกับเชื้อ (Cino, 1999) ในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรกของกระบวนการนี้จะเติม MF ในอัตราที่ต่ำมาก (ไม่เกิน 2 กรัมต่อชั่วโมง) ซึ่งค่า DOT ในระยะนี้จะขึ้น ๆ ลง ๆ เนื่องจากมีปริมาณเมธานอลสะสมในน้ำหมัก จากนั้นค่า DOT จะเริ่มคงที่ สำหรับกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อค่า DOT เริ่มคงที่ อุณหภูมิจะถูกปรับให้ค่อย ๆ ลดลงจาก 30 องศาเซลเซียสเป็น 20 องศาเซลเซียส และสภาวะในการผลิตจะทำที่ 20 องศาเซลเซียสตลอดกระบวนการผลิต ระหว่างกระบวนการผลิตในขั้นนี้ อัตราการเติม MF จะมีการปรับให้เพิ่มขึ้นทีละนิดทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่ง 90 ชั่วโมงของระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ (induction time) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตในขั้นตอนนี้ น้ำหมักและตัวเซลล์จะถูกแยกออกจากกันโดยกระบวนการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นส่วนของน้ำหมักจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ในระหว่างกระบวนการหมัก จะเก็บตัวอย่างเมื่อสิ้นสุดกระบวนการในขั้นที่หนึ่งและสอง สำหรับในระหว่างกระบวนการหมักในขั้นที่สี่ จะเก็บตัวอย่างวันละครั้งจนสิ้นสุดกระบวนหมัก

ตัวอย่างที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่น (OD_{600}), น้ำหนักเซลล์แห้ง, กิจกรรมของเอ็นไซม์ และคุณภาพของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งกระบวนการหมักทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3.1

3.1.4 การทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography purification technique)

น้ำหมักส่วนใส (culture supernatant) ที่ผ่านการกรองจะนำมาทำให้เข้มข้นและทำไดอะไลซิสในสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ (50 mM sodium acetate) ที่มีค่าพีเอช 5 โดยใช้ Vivaflow ที่มีขนาด 10 kDa cut off จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงนี้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ SP คอลัมน์ (cation exchanger column) กระบวนการทำให้บริสุทธิ์จะทำโดยใช้เครื่อง FPLC (ÄKTA purifier, Amersham Pharcacia Biotech) ซึ่งก่อนเริ่มกระบวนทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ จะชะคอลัมน์ด้วย สารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 5 จากนั้นจึงฉีดตัวอย่างเข้าสู่ sampling loop ซึ่งเครื่องจะดูดตัวอย่างจาก sampling loop เข้าสู่ SP คอลัมน์ จากนั้นจึงล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 5 เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ จากนั้นจึงชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) เข้มข้นตั้งแต่ 0-1 โมลาห์ เป็นองค์ประกอบ ระหว่างกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์แต่ละส่วน (fraction) ที่ผ่านคอลัมน์จะถูกเก็บแบบอัตโนมัติโดยเครื่อง FPLC ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละส่วนจะวัดจากค่าการดูดกลืนแสง (Abs_{280}) โดยอัตโนมัติ ส่วนของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ (Flow-through) ส่วนที่ถูกล้าง (Wash fraction) และส่วนที่จับกับคอลัมน์อย่างจำเพาะซึ่งถูกชะออกมา (Elution fraction) จะถูกนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ (enzymatic activity) และตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งส่วนของ rEK_L ที่ถูกชะออกมาซึ่งมีกิจกรรมของเอ็นไซม์จะถูกนำมาเทรวมกัน และทำให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นจึงเก็บเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ในสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ ซึ่งมีกลีเซอรอล 50% เป็นส่วนประกอบ และเก็บเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (Total protein concentration) ในแต่ละส่วนที่ได้จากกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์จะถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Merk)

ตารางที่ 3.1 กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *P. pastoris* Y11430 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB Thrombin_EK_L (EK_L_thrombin) หรือ pPICZαB NH8_EK_L (NH8_EK_L) แทรกอยู่ในจีโนม โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน คือ 30 และ 20 องศาเซลเซียส

กระบวนการหมักครั้งที่	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้	อุณหภูมิที่ใช้ในช่วงเหนี่ยวนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน (องศาเซลเซียส)
หนึ่ง	EK_L_thrombin	30
สอง	NH8_EK_L	30
สาม	EK_L_thrombin	20
สี่	NH8_EK_L	20

3.1.5 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์

ค่ากิจกรรมของ rEK_L จะถูกวิเคราะห์โดยใช้สับเสรตคือ Gly-$(Asp)_4$-Lys-β-Naphythylamide โดยจะเติมตัวอย่างน้ำหมักที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ลงในคิวเวท (Cuvette) ซึ่งมีสารละลายสับสเตรต 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 50 ไมโครโมลาห์ Gly-$(Asp)_4$-Lys-β-Naphythylamide ละลายใน สารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาห์ พีเอช 8 และ DMSO ความเข้มข้น 10 % (ปริมาตรโดยปริมาตร) จากนั้นผสมโดยทันทีและวางคิวเวทดังกล่าวลงในเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์จะวิเคราะห์จากอัตราเร็วในการปลดปล่อย β-Naphythylamide ซึ่งเกิดจากการตัดที่ตำแหน่งตัดจำเพาะโดยเอ็นไซม์ rEK_L ซึ่งการตรวจวัดค่าการเพิ่มขึ้นของ β -Naphythylamide จะสามารถตรวจได้จากค่าการเพิ่มขึ้นของค่าฟลูออเรสเซนต์ที่สภาวะการกระตุ้นที่ 337 นาโนเมตร และปลดปล่อยที่ 420 นาโนเมตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดังนั้น 1 หน่วยของเอ็นไซม์คือ หน่วยของฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นในเวลา 1 นาที

นอกจากนี้การวิเคราะห์กิจกรรมของเอ็นไซม์ยังวิเคราะห์จากความสามารถในการตัดฟิวชันโปรตีนซึ่งมีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ EK ที่ส่วนเชื่อมต่อ คือ rice BGlu1-thioredoxin (Chenchor *et. al.*, 2006) โดยใช้ rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้ตัดฟิวชันโปรตีนในสารละลาย Tris-Cl ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 8 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวิเคราะห์

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของเจล 15% โดยผลการตัดฟิวชันโปรตีนที่ได้จากงานวิจัยนี้จะนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการใช้ rEK_L ที่ผลิตขายตามท้องตลาดซึ่งเป็นของบริษัท NEB

3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.2.1 การแสดงออกของยีน EK_L

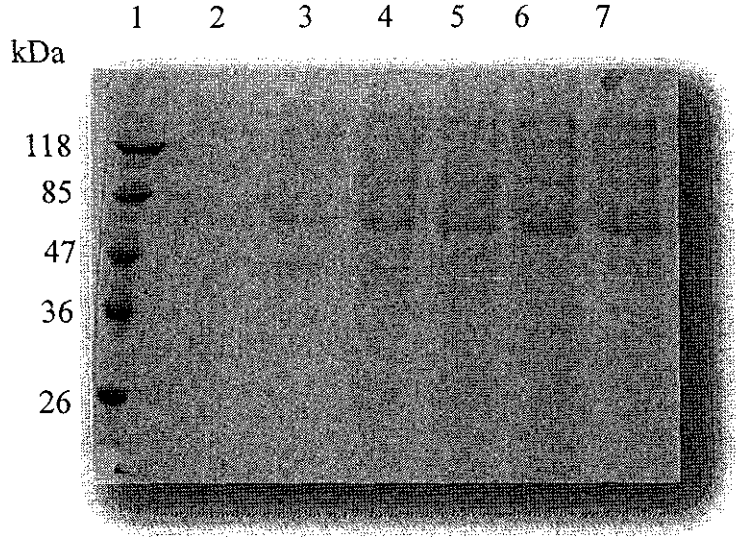
หลังจากตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทดลองส่วนที่ 1 (pGEM-T easy_EK_L จากวัว) ด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI และ *Sac*II แล้วจึงแทรกชิ้นดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L เข้าในพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกคือ pPICZαB Thrombin และ pPICZαB NH8 จากนั้นเมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองโดยเฉพาะส่วนที่เป็นรอยต่อระหว่างพลาสมิดและชิ้นยีน EK_L มีความถูกต้องตามที่ออกแบบไว้ รวมทั้งลำดับการอ่าน (reading frame) ก็มีความถูกต้องด้วย ดังนั้นจึงตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองนี้ให้เป็นเส้นตรงด้วย *Sac*I และถ่ายเข้าสู่ *P. pastoris* Y11430 โดยใช้วิธีอิเล็คโตรพอเรชันเพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ AOX1 ระหว่างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและจีโนมของยีสต์ จากนั้นหลังจากทดสอบการแทรกตัวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่จีโนมของ *P. pastoris* โดยใช้เทคนิค colony PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน EK_L ซึ่งพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งมีขนาด 700 คู่เบสในโคลนที่ให้ผลเป็นบวก ซึ่งโคลนที่ให้ผลเป็นบวกนี้จะถูกนำไปทดสอบความสามารถในการแสดงออกของยีน EK_L ในระดับฟลาสก์เขย่าโดยใช้อาหาร BMGY ซึ่งหลังจากผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน EK_L โดยใช้ 99% เมธานอลแล้วตัวเซลล์จะถูกนำไปตรวจหา mRNA ของยีน EK_L โดยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน EK_L ผลการทดลองในขั้นตอนนี้แสดงให้เห็นว่า โคลนที่มีการแทรกตัวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและมีการแสดงออกของยีน EK_L เท่านั้นที่สามารถตรวจพบ EK_L mRNA ได้ ซึ่งผลิตภัณฑ์ของ RT-PCR ที่ได้มีขนาด 700 คู่เบส (มิได้แสดงข้อมูล) แต่เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากโคลนที่ให้ผลเป็นบวกไปทำให้เข้มข้นขึ้นและวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie blue R 250 พบว่า สามารถตรวจพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 43 kDa ซึ่งพบเฉพาะโคลนที่มีการแสดงออกของ EK_L mRNA เท่านั้น และไม่พบแถบโปรตีนขนาดดังกล่าวในชุดควบคุม (มิได้แสดงข้อมูล) แต่เมื่อนำน้ำหมักจากตัวอย่างที่พบแถบโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น rEK_L นี้ไปทดสอบกิจกรรมเอ็นไซม์ก็พบว่า ไม่พบกิจกรรมของเอ็นไซม์ ซึ่งข้อสันนิษฐานสำหรับปัญหาดังกล่าวคือ ปริมาณ rEK_L ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำหมักที่เพาะเลี้ยงโดยระบบฟลาสก์เขย่ามีปริมาณ

น้อยมาก ดังนั้นโคลนที่ให้ผลเป็นบวกจากการทดลอง RT-PCR นี้จะถูกคัดเลือกและนำไปใช้ในการผลิต rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตรเพื่อเพิ่มปริมาณ rEK_L ที่ปลดปล่อยออกมาในน้ำหมัก

3.2.2 การผลิตเอ็นไซม์ rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก ตัวอย่างของน้ำหมักที่เก็บหลังจากสิ้นสุดกระบวนการในสองขั้นตอนแรกของการหมัก (Glycerol batch และ Glycerol fed-batch phase) และตัวอย่างซึ่งเก็บในระหว่างขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมัก (Methanol production phase) ซึ่งได้จากกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิ 30 และ 20 องศาเซลเซียส ตัวอย่างทั้งหมดนี้จะถูกนำมาวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีน, หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง, กิจกรรมของเอ็นไซม์ ซึ่งได้ผลคือ การวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่า รูปแบบของแถบโปรตีนที่พบในน้ำหมักของเชื้อที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB Thrombin_EK_L และ pPICZαB NH8_EK_L แทรกอยู่ในจีโนม มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน จากรูปที่ 3.1 ซึ่งแสดงการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนในน้ำหมักส่วนใสของกระบวนการหมักครั้งที่สอง ซึ่งใช้เชื้อที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB NH8_EK_L แทรกอยู่ในจีโนมโดยอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนคือ 30 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาจากรูปจะเห็นว่ามีแถบโปรตีนขนาด 63 kDa ถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำหมักซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่พบในน้ำหมักและสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ได้ในตัวอย่างที่เก็บระหว่างขั้น Methanol production phase เมื่อสังเกตความเข้มของแถบโปรตีนขนาด 63 kDa จะพบว่าความเข้มของแถบโปรตีนจะเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในช่วง Methanol production phase ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบขนาดของ rEK_L ที่ผลิตได้ในถังหมักและในฟลาสก์เขย่าพบว่า rEK_L ที่ผลิตได้ในถังหมักมีขนาดใหญ่กว่าในฟลาสก์เขย่า ซึ่งในปี 1999 Bretthayer and Castellino พบว่า ความแตกต่างของขนาดของโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (Oligosaccharide) ในกระบวนการไกลคอสิเลชันจะมีความเกี่ยวข้องกับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อว่าเป็นระบบฟลาสก์เขย่าหรือในถังหมัก ดังนั้นขนาดที่แตกต่างกันของ rEK_L ที่ผลิตในระบบฟลาสก์เขย่าและในถังหมักในงานวิจัยนี้อาจมีสาเหตุจากความแตกต่างของขนาดโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่เติมเข้าที่โมเลกุลโปรตีนระหว่างเกิดไกลคอสิเลชันเนื่องจากองค์ประกอบอาหารรวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* มีความแตกต่างกันระหว่างการเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าและการเลี้ยงในถังหมัก นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่ามีโปรตีนชนิดอื่นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เซลล์ *Pichia* ปลดปล่อยออกมาในน้ำหมัก ซึ่งถือเป็นข้อดีคือ ทำให้การแยกผลิตภัณฑ์ rEK_L ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักทำได้ง่ายขึ้น เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่ามีขนาดใหญ่กว่างานวิจัยอื่น ๆ ที่ผลิต rEK_L ใน *P. pastoris* ซึ่งจะได้ rEK_L ขนาดประมาณ 43 kDa (Peng *et. al.*, 2004) ซึ่งข้อสันนิษฐานคือ เนื่องจากสายพันธุ์ของยีสต์ *P. pastoris* ที่ใช้ในการผลิตมีความ

แตกต่างกัน งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ผลิต rEK_L โดยใช้ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y11430 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมทำให้รูปแบบการเกิดไกลคอสิเลชัน (Glycosylation) อาจมีความแตกต่างกับสายพันธุ์ GS115 ที่ใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ (Peng *et. al.*, 2004; Fang *et. al.*, 2004; Vozza *et. al.*, 1996) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม สำหรับข้อมูลต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้จากกระบวนการหมักในแต่ละครั้งสรุปไว้ในตารางที่ 3.2

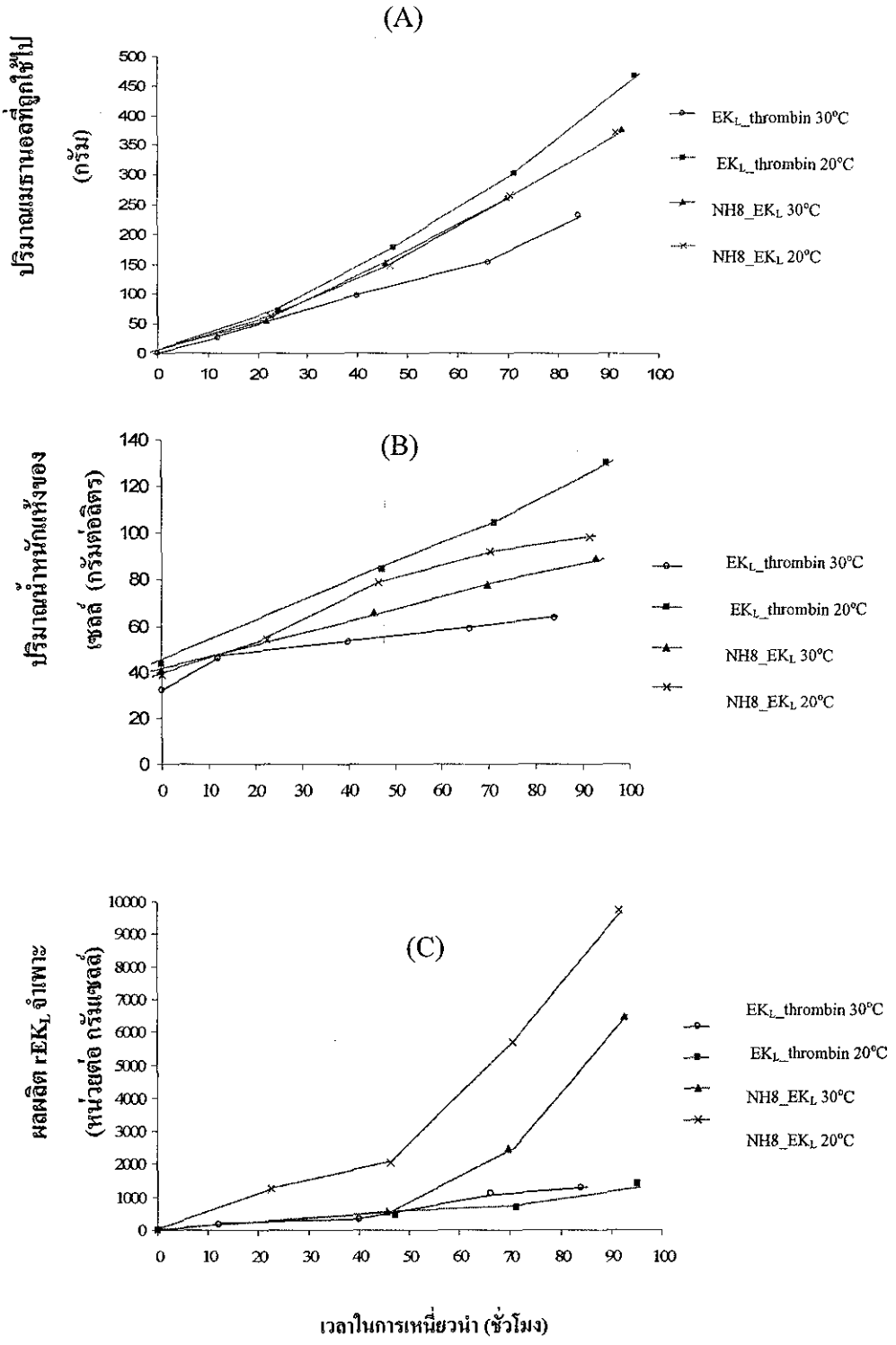


รูปที่ 3.1 แสดงการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนในน้ำหมักส่วนใสซึ่งได้จากกระบวนการหมักครั้งที่สอง โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE เลนที่ 1 แสดงโมเลกุลโปรตีนเครื่องหมาย (Prestain molecular marker) (Fermentas) เลนที่ 2 และ 3 แสดงตัวอย่างของน้ำหมักที่เก็บเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในขั้น Glycerol batch และ fed-batch ตามลำดับ เลนที่ 4 ถึง 7 แสดงตัวอย่างที่เก็บระหว่างกระบวนการหมักในขั้น Methanol production phase ที่ 21, 45, 69 และ 92 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณเมธานอลที่ถูกใช้, กิจกรรมของ rEK_L ที่วิเคราะห์จากตัวอย่างน้ำหมักส่วนใสในการหมักแต่ละครั้ง [ ] แสดงถึงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ละชนิดที่ถ่ายเข้าสู่เชื้อ; ( ) แสดงถึงเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนซึ่งแสดงในหน่วยชั่วโมง; เวลาที่แสดงเครื่องหมาย * แสดงถึงเวลาในช่วง Methanol production เท่านั้น

การหมักครั้งที่	อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต rEK_L (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุด Glycerol batch phase (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุด Glycerol fed-batch phase (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเมธานอลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุด Methanol production phase (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตจำเพาะของ rEK_L (หน่วยต่อกรัมเซลล์)
การหมักครั้งที่หนึ่ง [EK_L_thrombin]	30	32.14 (24.5 h)	39.11 (4 h)	233.9 (84 h*)	63.74	1,272
การหมักครั้งที่สอง [_NH8_EK_L]	30	17.06 (22.7 h)	40.83 (3.5 h)	375.9 (92.6 h*)	89.33	6,475
การหมักครั้งที่สาม [EK_L_thrombin]	20	29.24 (20.75 h)	43.55 (4 h)	467.4 (95.2 h*)	130.17	1,407
การหมักครั้งที่สี่ [_NH8_EK_L]	20	12.5 (21.5 h)	38.98 (4 h)	371.2 (91.5 h*)	98.26	9,730

จากข้อมูลในตารางที่ 3.2 พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในขั้น Glycerol batch phase น้ำหนักเซลล์แห้งในการหมักแต่ละครั้งจะมีค่าประมาณ 12 ถึง 32 กรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในขั้น Glycerol fed-batch phase พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 40 กรัมต่อลิตรในการหมักทุกครั้ง ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหมายไว้ จากการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งในการหมักแต่ละครั้งจะเห็นว่า การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งแปรผันโดยตรงกับปริมาณของเมธานอลที่เชื้อใช้ไปในการหมักแต่ละครั้งและขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอีกด้วย (รูปที่ 3.2) จากรูปที่ 3.2A และ 3.2B จะสังเกตเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบจากเชื้อที่มีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดชนิดเดียวกัน น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จาก

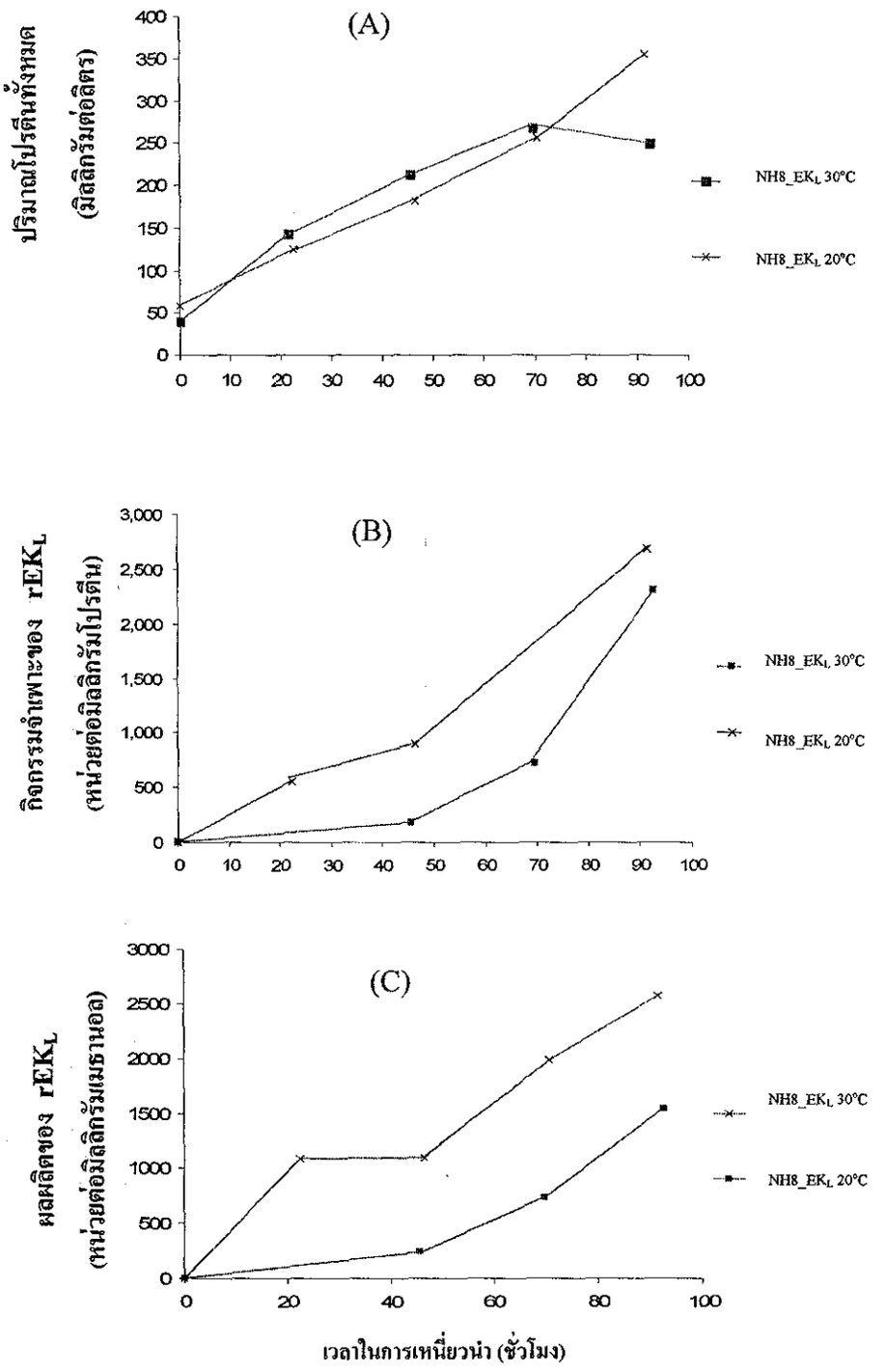


รูปที่ 3.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (A) ปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด (B) น้ำหนักเซลล์แห้ง (C) ผลผลิตจำเพาะของ rEK_L กับเวลาในการเหนี่ยวนำ ซึ่งได้จากการหมักแต่ละครั้ง โดยใช้อุณหภูมิในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ 30 และ 20 องศาเซลเซียส

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิต่ำจะมีปริมาณมากกว่าเมื่อผลิตที่อุณหภูมิสูง เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของมวลเซลล์ (biomass yield) ($Y_{x/s}$) ในการหมักแต่ละครั้งคือ 0.2 (กรัมเซลล์ต่อกรัมเมธานอลที่ใช้ไป)ซึ่งไม่ความแตกต่างกันในการหมักแต่ละครั้ง แต่เมื่อพิจารณาจากค่าผลผลิตจำเพาะ (specific production yield) (หน่วยต่อกรัมเซลล์) พบว่า ค่าผลผลิตจำเพาะในการหมักแต่ละครั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเมธานอลถูกใช้ในปริมาณที่สูงขึ้น (รูปที่ 3.2C และ 3.2A ตามลำดับ) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มอัตราการเติมเมธานอล สามารถเพิ่มปริมาณของ rEK_L ได้ (โดยสามารถตรวจได้จากการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอ็นไซม์) อย่างไรก็ตาม การปรับอัตราการเติมเมธานอลยังต้องขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้เมธานอลของเชื้อในการหมักแต่ละครั้งด้วย เมื่อเปรียบเทียบค่าผลผลิต rEK_L จำเพาะ ($Y_{p/x}$) (หน่วยต่อกรัมเซลล์) ระหว่างเชื้อที่มีการแทรกตัวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่างกัน (pPICZαB Thrombin_EK_L และ pPICZαB NH8_EK_L) พบว่าผลผลิตจำเพาะที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อที่มีการแทรกตัวของ pPICZαB NH8_EK_L สูงกว่าการใช้เชื้อที่มีการแทรกตัวของ pPICZαB Thrombin_EK_L ไม่ว่าจะหมักที่อุณหภูมิ 30 หรือ 20 องศาเซลเซียสก็ตาม (รูปที่ 3.2C) อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก rEK_L จากการผลิตโดยใช้เชื้อที่มีการแทรกตัวของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองประเภทไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยอาศัยการจับกันระหว่างพอลิฮีสติดีนที่โมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและนิกเกิลคอลัมน์ (Nickel column) ดังนั้นจึงไม่สามารถบอกได้ว่าความแตกต่างของกิจกรรมเอ็นไซม์ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากอิทธิพลของพอลิฮีสทิดีนที่อยู่ตำแหน่งต่างกันของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งจากความแตกต่างของกิจกรรมเอ็นไซม์ที่เกิดขึ้นนี้อาจมีผลมาจากความแตกต่างทางกายภาพของแต่ละโคลน หรือ clonal variation การเกิด clonal variation นี้เป็นปัจจัยสำคัญและมีอิทธิพลต่อปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ ในปี 2006 Viader-Salvado และคณะ รายงานว่า การเกิด clonal variation เกิดขึ้นได้เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่เชื้อ ซึ่งนักวิจัยพบว่า โคลนที่เกิดความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมหลังจากกระบวนการถ่ายยีนน้อยที่สุด จะสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้สูงที่สุด

สำหรับการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต rEK_L ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกศึกษาโดยใช้โคลนที่ได้รับการถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB NH8_EK_L เพียงอย่างเดียว เนื่องจากปริมาณ rEK_L ที่ได้จากเชื้อที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pPICZαB NH8_EK_L มีปริมาณสูงกว่า pPICZαB Thrombin_EK_L มาก ในการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต rEK_L โดยใช้เชื้อที่ได้รับการถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB NH8_EK_L พบว่า ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการผลิตที่อุณหภูมิ 30 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 3.3A) นอกจากนั้นยังพบว่า ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ผลิตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ลดลงเล็กน้อยหลังจากการเติมอาหาร MF ลงในถังหมักเกินกว่า 250 มิลลิกรัม แต่ไม่พบการลดลงของโปรตีนเมื่อ

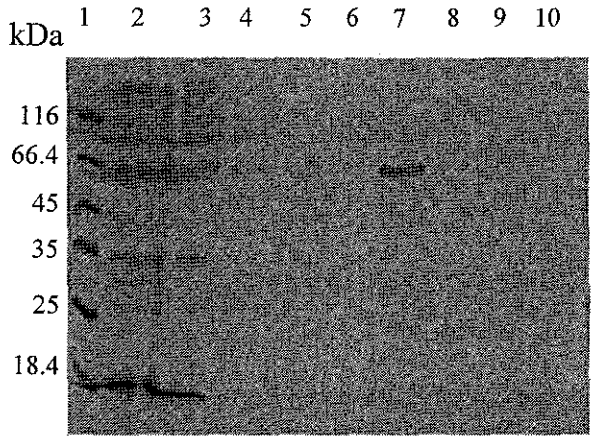
ผลิตที่ 20 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาจากผลผลิต rEK_L จำเพาะ (หน่วยต่อกรัมเซลล์) ในกระบวนการหมักครั้งที่สองและสี่จากรูปที่ 3.2C พบว่า ผลผลิต rEK_L จำเพาะที่ผลิตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (survival cell) ที่ได้จากการผลิต rEK_L ที่อุณหภูมิต่ำมีปริมาณมากกว่าที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นทำให้เชื้อเกือบทั้งหมดในน้ำหมักที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำสามารถใช้เมธานอลที่เติมลงในอาหารเพื่อเหนี่ยวนำให้โปรโมเตอร์ AOX1 ทำงานได้ ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้กิจกรรมเอ็นไซม์ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่ำสูงกว่าที่อุณหภูมิสูงเมื่อเปรียบเทียบในปริมาณเซลล์ที่เท่ากันเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมจำเพาะของ rEK_L (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และผลผลิตของ rEK_L ($Y_{p/s}$) (หน่วยต่อมิลลิกรัมเมธานอลที่ถูกใช้ไป) พบว่า ทั้งกิจกรรมจำเพาะและผลผลิตของ rEK_L ที่ได้จากการผลิตที่ 20 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.3B และ 3.3C ตามลำดับ) เนื่องจากปริมาณ rEK_L ซึ่งได้จากการผลิตที่ 20 องศาเซลเซียสมีปริมาณสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการผลิต rEK_L ทั้งสองอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่ได้จากการผลิตที่ 20 องศาเซลเซียสจึงสูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน รวมทั้งปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ 20 องศาเซลเซียสที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียสซึ่งทำให้เซลล์สามารถใช้เมธานอลในอาหารได้ดีกว่าที่ 30 องศาเซลเซียสจึงทำให้ผลผลิตของ rEK_L ที่ 20 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบต่อปริมาณเมธานอลที่เท่ากัน จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิต่ำสามารถเพิ่มปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและปริมาณเซลล์ได้ ในปี 2004 Woo และคณะพบว่า ปริมาณเซลล์ตายของยีสต์ *P. pastoris* (death cell) ที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิต่ำในขั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนจะมีปริมาณต่ำ (ต่ำกว่า 2%) และกิจกรรมของเอ็นไซม์โปรติเอส (Proteases) จากเซลล์ที่ตายก็ลดลงด้วย สำหรับอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีต่อคุณภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ ได้ทำการพิจารณาหลังจากการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์



รูปที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (A) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (B) กิจกรรมจำเพาะของ rEK_L และ (C) ผลผลิตของ rEK_L กับเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในกระบวนการผลิต rEK_L โดยใช้เชื้อ *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαB NH8_EK_L

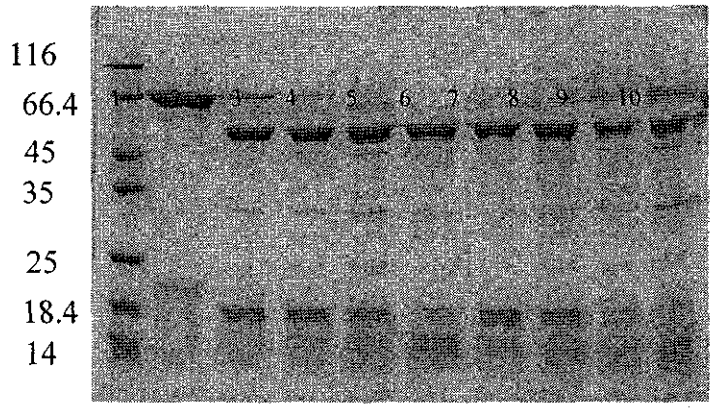
3.2.3 การทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์และการทดสอบคุณสมบัติของเอ็นไซม์

หลังจากชะ rEK_L ออกจาก SP คอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น 0-1 โมลาห์ แต่ละส่วนที่ได้จากกระบวนการแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ถูกนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอ็นไซม์และคุณภาพของโปรตีน ผลการทดสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์พบว่า กิจกรรมของเอ็นไซม์ rEK_L เกือบทั้งหมดพบอยู่ในส่วนที่ผ่านการชะออกมาจากคอลัมน์ (elution fraction) แต่ไม่พบกิจกรรมของเอ็นไซม์ rEK_L ในส่วนที่ผ่านจากคอลัมน์ (flow through) และไม่พบในส่วนที่ล้างคอลัมน์ (wash fraction) หลังจากการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Blue R 250 พบว่า แถบโปรตีนที่พบในส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์มีเพียงขนาดเดียวคือ 63 kDa และไม่พบโปรตีนที่มีขนาดดังกล่าวในส่วนที่ผ่านจากคอลัมน์และส่วนที่ล้างคอลัมน์ (รูปที่ 3.4) จากนั้นจึงนำส่วนที่ผ่านการชะออกจากคอลัมน์ที่ตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์เทรวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้นและนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนพบว่า ความเข้มข้น rEK_L บริสุทธิ์ที่ผลิตที่ 30 องศาเซลเซียสคือ 224 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้น rEK_L บริสุทธิ์ที่ผลิตที่ 20 องศาเซลเซียสซึ่งได้ 433 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าปริมาณ rEK_L บริสุทธิ์ที่ได้จากการผลิตที่ 20 องซาเซลเซียสจะมีปริมาณมากกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมจำเพาะของrEK_L บริสุทธิ์ระหว่างสองอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตโปรตีนพบว่า กิจกรรมจำเพาะของ rEK_L บริสุทธิ์ที่ได้จากการผลิตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่า 170,926 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนบริสุทธิ์ ซึ่งต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งได้ 213,016 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนบริสุทธิ์ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิต่ำไม่สามารถเพิ่มคุณภาพของโปรตีนที่ผลิตขึ้นได้ เพียงแต่สามารถเพิ่มผลผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตขึ้นได้เท่านั้น rEK_L ที่บริสุทธิ์จะถูกเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บเอ็นไซม์โดยใช้ Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 7 ซึ่งมีกลีเซอรอลเข้มข้น 50% เป็นองค์ประกอบ และเก็บเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการตัดสับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีนต่อไป



รูปที่ 3.4 แสดงผลการวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนในแต่ละส่วนที่ได้จากกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ เลนที่ 1 แสดงโมเลกุลโปรตีนเครื่องหมาย (protein molecular marker) เลนที่ 2 แสดงตัวอย่างก่อนกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ เลนที่ 3 ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (flow through) เลนที่ 4 ส่วนที่ล้างจากคอลัมน์ (wash fraction) เลนที่ 5 ถึง 10 ส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (elution fraction) ส่วนที่ 43, 44, 51, 53, 55 และ 57 ตามลำดับ

เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์จะถูกนำมาการทดสอบคุณสมบัติในการตัดฟิวชันโปรตีนคือ rice BGlu1-thioredoxin (Chuenchor *et al.*, 2006) ซึ่งปฏิกิริยาในการตัดจะทำใน Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 8 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยผลการทดลองที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการตัดด้วยอีนไซม์ rEK_L ที่ขายตามท้องตลาดจากบริษัท NEB จากผลการทดลองพบว่า รูปแบบของผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการตัดโดย rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้ซึ่งผลิตที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส และ rEK_L ที่ผลิตขายตามท้องตลาดมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 3.5) ซึ่งจากรูปที่ 3.5 จะเห็นว่าผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากปฏิกิริยาการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้และจากท้องตลาดมีขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งสรุปได้ว่า rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถตัดฟิวชันโปรตีนได้จริงและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดก็มีรูปแบบที่เหมือนกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ผลิตขายทั่วไป ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักในการผลิต rEK_L ในราคาถูกเพื่อใช้ในงานวิจัยทางด้านรีคอมบิแนนท์โปรตีนในห้องปฏิบัติจึงบรรลุวัตถุประสงค์



รูปที่ 3.5 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ผลิตที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส และ rEK_L ที่ขายตามท้องตลาด ปฏิกิริยาในการตัดฟิวชันโปรตีนจะทำใน Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาห์ พีเอช 8 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตร 22 ไมโครลิตร เลนที่ 1 แสดงโมเลกุลโปรตีนเครื่องหมาย (protein molecular marker) (Fermentas) เลนที่ 2 แสดงฟิวชันโปรตีนที่ไม่มีการเติมเอ็นไซม์ rEK_L ลงในปฏิกิริยา เลนที่ 3 ถึง 5 แสดงผลิตภัณฑ์ของฟิวชันโปรตีนที่เกิดจากการตัดของ rEK_L ที่ได้จากการผลิตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในปริมาณต่างๆ กัน ซึ่งได้แก่ 0.093 , 0.279 และ 0.651 ไมโครกรัม ตามลำดับ เลนที่ 6 แสดงผลิตภัณฑ์ของฟิวชันโปรตีนที่เกิดจากการตัดของ rEK_L ที่ผลิตขายตามท้องตลาด (NEB) เลนที่ 7 ถึง 10 แสดงผลิตภัณฑ์ของฟิวชันโปรตีนที่เกิดจากการตัดของ rEK_L ที่ได้จากการผลิตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสในปริมาณต่างๆ กัน ซึ่งได้แก่ 0.193, 0.579, 0.965 และ 1.351 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3.3 บทสรุป

EK_L ที่โคลนได้จากงานวิจัยส่วนที่ 2 สามารถนำมาผลิตได้ในยีสต์ และหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้ว rEK_L ที่ผลิตได้สามารถนำมาตัดฟิวชันโปรตีน แล้วให้ผลไม่ต่างจาก rEK_L ที่ผลิตขายตามท้องตลาด

3.4 การเผยแพร่ผลงานจากงานวิจัยส่วนนี้

ผลการวิจัยส่วนนี้ได้ถูกนำไปเผยแพร่ ณ. งานประชุม The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products วันที่ 23-25 พฤษภาคม 2550 (ภาคผนวก ค) ณ.โรงแรมโฆษะ จ.ขอนแก่น ผลงานวิจัยนี้ได้รับคัดเลือกให้นำเสนอแบบปากเปล่า (oral presentation) ซึ่งเป็นงานประชุมนานาชาติ มีผู้เข้าร่วมงานกว่า 200 คน

บทที่ 4

บทสรุป

จากการทดลองในการเพิ่มจำนวนดีเอนเอที่เป็นส่วนของยีน EK_L จากลำไส้วัวและควายส่วนดูโอดินั่มโดยเทคนิค RT-PCR และ nested PCR พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากวัวและควายมีขนาดใกล้เคียงกันคือ 708 คู่เบส และสามารถทำนายลำดับกรดอะมิโนได้ 235 กรดอะมิโน จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากวัวที่ได้จากงานวิจัยนี้, วัวใน GenBank และควาย พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากวัวที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความเหมือนกับโปรตีน EK_L จากวัวใน GenBank ถึง 99% และเหมือนกับควาย 97% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โปรตีน EK_L จากวัวและควายมีความใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากโคลน EK_L ที่ได้จากวัวในส่วนนี้มีความเหมือนกับ EK_L ในงานวิจัยอื่น ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่พบในวัวจากงานวิจัยนี้มีการเปลี่ยนแปลงเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น โดยเป็นตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของโมเลกุล ดังนั้นโคลนของ EK_L ที่ได้จากวัวในส่วนนี้จะถูกนำไปชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน EK_L

ในขั้นตอนของการผลิต rEK_L ในถังหมักและการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่า สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ EK ได้ในน้ำหมักที่มีการปลดปล่อย rEK_L ขนาด 63 kDa ในระหว่างกระบวนการหมักในขั้น Methanol production phase สำหรับการเปรียบเทียบอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิต rEK_L ที่มีต่อผลิตภัณฑ์ของ rEK_L ที่ได้พบว่า การผลิต rEK_L ที่อุณหภูมิต่ำไม่สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพของ rEK_L ที่ได้ เพียงแต่สามารถเพิ่มผลผลิตของ rEK_L ให้สูงขึ้น หลังจากสิ้นสุดกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุพบว่า ความเข้มข้นของ rEK_L บริสุทธิ์ที่ได้คือ 433 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ rEK_L ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ผลการทดสอบความสามารถในการตัดฟิวชันโปรตีน (rice BGlu1-thioredoxin) ซึ่งมีตำแหน่งตัดของ EK ที่บริเวณเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลโปรตีนพบว่า เอ็นไซม์ rEK_L บริสุทธิ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถตัดฟิวชันโปรตีนดังกล่าวได้จริง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้ และ rEK_L ที่ผลิตขาย (NEB) นั้น มีรูปแบบของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล SDS-PAGE ที่คล้ายคลึงกัน

บรรณานุกรม

Bretthauer, R. K., and Castellino, F. J. (1999). Glycosylation of *Pichia pasoris*-derived proteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 30: 193-200.

Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M., and Enfors, S-V. (2005). Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 27: 399-409.

Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Yuvaniyama, J., Opassiri, R., Svasti, J., and Ketudat-Cairns, J. R. (2006). Purification, crystallization and preliminary x-ray analysis of rice BGlu1 β-glucosidase with and without 2-deoxy-2-fluoro-β-D-glucosidase. **Acta Cryst.** 1-4.

Choi, S. L., Song, H. W., Moon, J. W., and Seong, B. L. (2001). Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. **Biotechnol. Bioeng.** 75 (6): 718-724.

Collins-Racies, L. A., Mccolgan, J. M., Grant, K. L., DiBlasio-Smith, E. A., McCoy, J. M., and LaVallie, E. R. (1995). Production of recombinant catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. **Biotechnol.** 13: 982-987.

Fang, L., Sun, Q. M., and Hua, Z. C. (2004). Expression of recombinant Chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P. pastoris* and its purification and characterization. **Acta Biochemica et Biophysica Sinica.** 36 (7): 513-517.

Gasparian, M. E., Ostapchenko, V. G., Schulga, A. A., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2003). Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli.* **Protein Expr. Purif.** 31: 133-139.

Inan, M., and Meagher, M. M. (2001). Non-repressing carbon source for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*, **J. Biosci. Bioeng.** 92: 585-589.

Invitrogen. (n.d.). **pPICZα A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on zeocin and purification of secreted, recombinant proteins (Catalog no. v195-20).** (n.p.).

Kim, H. J., Kim, Y. H., Roh, Y. H., Seong, B. L., and Shin, C. S. (2005). Optimization of enterokinase fermentation using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae.* **Process Biochem.** 40: 717-722.

La Vallie, E. R., Rehemtulla, A., Racie, L. A., DiBlasio, E. A., Ferenz, C., Grant, K. L., Light, A., and McCoy, J. M. (1993). Cloning and functional expression of cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. **J. Biol. Chem.** 31: 23311-23317.

Lin Cereghino, J., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microb. Rev**. 24: 45-66.

McCormick, M., and Berg , J. (n.d.). " Recombinant Enterokinase Cleavage of Fusion Protein," [Online]. Available from: *http://www.emdbiosciences.com/docs/NDIS/inno05-001.pdf*.

Peng, L., Zhong, X., and Ou, J. (2004). High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*. **J. Biotechnol.** 108: 185-192.

Song, H. W., Choi, S. I., and Seong, B. L. (2002). Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: Effect of N-terminal modification, **Archives of Biochem. Biophys.** 400 (1): 1-6.

Svetina, M., Krasevec, N., and Gaberc-Porekar, V. (2000). Expression of catalytic subunit of bovine enterokinase in the filamentous *Aspergillus niger*. **Biotechnol.** 76: 245-251.

Viader-Salvadó, J. M., Cab-Barrera, E. L., Galán-Wong, L. J., and Guerrero-Olazarán, M. (2006). Genotyping of recombinant *Pichia pastoris* strains. **Cellular and Molecular Biology letters.** 11 (3): 348-359.

Vozza, L. A., Wittwer, L., and Higgins, D. R. (1996). Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol.** 14: 77-81.

Woo, J. H., Liu, Y. Y., Stavrou, S., and Neville, D. M. (2004). Increasing secretion of a bivalent anti-t-cell immunotoxin by *P. pastoris*. **Appl. Environ. Microbiol.** 3370-3376.

Yuan, L. D., and Hua, Z. C. (2002). Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** 25: 300-304.

Yuan, X., Zheng, X., Lu, D., Rubin, D. C., Pung, C. Y. M., and Sadler, J. E. (1998). Structure of murine enterokinase (enteropeptidase) and expression in small intestine during development. **Am. J. Physiol.** 274: G342-G349.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Submission GenBank Accession number DQ518426

NCBI Nucleotide
My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search CoreNucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: DQ518426. Reports Bubalus bubalis e...[gi:99909347] Links

Features Sequence

```
LOCUS       DQ518426                 708 bp    mRNA    linear   MAM 29-MAY-2006
DEFINITION  Bubalus bubalis enterokinase light chain mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ518426
VERSION     DQ518426.1  GI:99909347
KEYWORDS    .
SOURCE      Bubalus bubalis (water buffalo)
  ORGANISM  Bubalus bubalis
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
            Pecora; Bovidae; Bovinae; Bubalus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 708)
  AUTHORS   Kupradid,C., Promprapagorn,A. and Ketudat-Cairns,M.
  TITLE     Cloning of buffalo enterokinase light chain
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 708)
  AUTHORS   Kupradid,C., Promprapagorn,A. and Ketudat-Cairns,M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-APR-2006) Biotechnology, Suranaree University of
            Technology, 111 University Avenue, Muang District, Nakhon
            Ratchasima 30000, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..708
                     /organism="Bubalus bubalis"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:89462"
     CDS             <1..708
                     /note="protease"
                     /codon_start=1
                     /product="enterokinase light chain"
                     /protein_id="ABF68839.1"
                     /db_xref="GI:99909348"
                     /translation="IVGGSDSKEGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVIRDWLVSAAHCVY
                     GRNMEPSKWKAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKDNDIAMMHLEMKV
                     NYTDYIQPICLPEENQVFSPGRICSIAGWGTLIYQGSTADVLQEADVPLLSNEKCQQQ
                     MPEYNITENMVCAGYEAGGVDSCQGDSGGPLMCQENNRWLLAGVTSFGYKCALPNRPG
                     VYARVPRFTEWIQSFLH"
ORIGIN
       1 attgtcggag gaagtgactc caaagaagga gcctggcctt gggtcgttgc tctgtatttc
      61 gacgatcaac aggtctgcgg agcttctctg gtgatcaggg attggctggt gtcggccgcc
     121 cactgcgtgt acgggagaaa tatggagccg tctaagtgga aagcagtgct aggcctgcat
     181 atggcatcaa atctgacttc tcctcagata gaaactaggt tgattgacca aattgtcata
     241 aacccacact acaataaacg gagaaaggac aatgacatcg ccatgatgca tcttgaaatg
     301 aaagtgaact acacagatta tatacagcct atttgtttac cagaagaaaa tcaagttttt
     361 tccccaggaa gaatttgttc tattgctggc tgggggacac ttatatatca aggttctact
     421 gcagacgtac tgcaagaagc tgacgttccc cttctatcaa atgagaaatg tcaacaacag
     481 atgccagaat ataacattac ggaaaatatg gtgtgtgcag gctacgaagc aggaggggta
     541 gattcttgtc agggggattc aggcggacca ctcatgtgcc aagaaaacaa cagatggctc
     601 ctggctggcg tgacgtcatt tggatataag tgtgcactgc ctaatcgccc aggggtgtat
     661 gcccgggtcc caaggttcac agagtggata caaagttttc tacattag
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Aug 28 2007 16:53:42

ภาคผนวก ข

ได้รับคัดเลือกให้นำเสนอด้วยวาจาในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา

แห่งชาติ ครั้งที่ 6 ณ. จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549

BUFFALO ENTEROKINASE LIGHT CHAIN CLONING

การโคลนยีนเอนเทอโรไคเนสสายสั้นจากควาย

*Chanida Kupradid and Mariena Ketudat-Cairns**

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand, ketudat@sut.ac.th

*ชนิดา กุประดิษฐ์ และ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์**

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

Abstract

Recently, with advances in genetic engineering, the use of fusion proteins as a tool for recombinant protein production is well known in the biopharmaceutical and biotechnology industry. To separate the interested protein in the purification step, proteases enzymes have been used to cleave the specific site of the fusion protein. Enterokinase is one of the most popular protease used to cleave fusion protein because of its high specificity and wide range of reaction conditions. Enterokinase is a serine protease which digests specific amino acid sequence of $(Asp)_4$-Lys and convert trypsinogen into the active trypsin. The buffalo enterokinase light chain (catalytic domain) gene was cloned from the buffalo duodenum tissue. RT-PCR and nested PCR techniques were used to amplify the mRNA templates which encode the enterokinase light chain gene. The enterokinase nucleotide sequence of buffalo was compared with cow, pig, chimpanzee, human and rat enterokinase light chain sequence from GenBank, the similarity of this fragment sequence was 98%, 89%, 85%, 85% and 81%, respectively. The nucleotide sequence of buffalo enterokinase light chain cDNA encodes a 235 amino acid polypeptide that share the same catalytic site, His 41, Asp 92, Ser 187, among the mammalian enterokinase light chain. The comparison of enterokinase amino acid sequence between cow and buffalo showed 97 % identity. This result indicated that the buffalo enterokinase light chain is closely related to bovine enterokinase light chain.

Introduction

The use of fusion proteins as a tool for recombinant protein production is well known. Fusing the coding sequence for a desired recombinant protein to a well-expressed gene has several advantages. Most fusion protein strategies position the protein of interest at the C-terminal end of the highly expressed fusion partner, which allows translation initiation to occur on a "proven" gene sequence that is known to be well translated, thus ensuring high expression levels of the desired protein (1). To obtain the interested protein, the fusion tagged is removed by using chemical reagent or enzyme in the final step. Compare with the chemical using of cyanogens bromide (CNBr), enzymatic cleavage has more advantage such as higher specific and milder reaction conditions (2). An important requirement for any fusion protein expression technology is the availability of site-specific proteases to cleave the interested protein from the fusion protein (3). Several highly specific proteases have been used for this purpose, including factor Xa, thrombin and enterokinase. Cleavage can occur within the recognition sequence, thus any amino acid downstream of the cleavage point are retained by the target protein. The complete removal of tag sequence requires that the cleavage point reside on the C-terminal side of the recognition sequence. Only factor Xa and enterokinase cleave target on the C-terminal side of the recognition sequence allowing complete removal of affinity tag sequence (4). Enterokinase displays a high degree of specificity for the recognition site, suitable for preparing target protein by cleavage at the fusion junction (3). More recently, enterokinase has been shown to have a broad utility in cleaving fusion protein. The enzyme is particularly suitable for this role because of its high degree of specificity, and its tolerance to a wide range of reaction conditions (5). This enzyme is capable of cleaving fusion protein at wide pH values, ranging from 4.5 to 9.5, at temperatures ranging from 4 to 45°C, and in the presence of various detergents and denaturants (6). An important characteristic of this enzyme is that its recognition sequence lies completely on the N-terminal side of the scissile bond, allowing any downstream fusion partner to retain its native amino-terminus (7). In all animal species studied, enterokinase is expressed highest in duodenum and rapidly decreases, becoming undetectable by the distal jejunum (8). The enterokinase enzymes have molecular weight range from 150,000 to 300,000 Dalton depending on the species (9). Mammalian enterokinases contain 30-50% carbohydrate, which may contribute to the apparent differences in polypeptide masses (10). The enzyme was reported to be composed of two chains, light chain and heavy chain, in cow and

three chains, light chain, mini chain and heavy chain, in human and pig (9). A transmembrane segment in the heavy chain anchors enterokinase in the brush border of duodenal enterocytes. The removal of heavy chain domain by reduction proteolysis or mutagenesis reduces the rate of trypsinogen activation ~ 500-fold, demonstrating that the heavy chain is necessary for optimal cleavage of trypsinogen (11). Available data indicated that in all cases the smaller polypeptide chain, called the light chain, is the catalytic chain (9). The light chain alone exhibits the proteolytic activity (12). The enterokinase enzyme from various organisms have been cloned and sequenced. The amino acid sequences of cow, human, pig, rat and mouse have been determined by cDNA cloning (13). The N-terminal amino acid is highly conserved among enterokinase light chains from various sources (3). The expression and purification of catalytic subunit of bovine enterokinase from *E. coli*, methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, filamentous fungus *Aspergillus niger* and *Saccharomycis cerevisiae* have been described. The recombinant proteins have high specific protease activity (13). The enterokinase light chain gene from buffalo has never been cloned and sequenced before. The close relations between cow and buffalo have been known. The properties of enterokinase light chain gene from buffalo and cow should be interesting to compare for enzymes relationship. Thus the buffalo enterokinase light chain gene was cloned and sequenced in this research.

In this work, cDNA encoding only the buffalo enterokinase light chain (not full length enterokinase gene) was cloned and sequenced. The cDNA and amino acid sequence of buffalo enterokinase light chain were compared to GenBank databases at the National Center for Biotechnology Information using the BLAST network severs (14). The data result from this research is the basic knowledge for the further expression work in the near future.

Research Methodologies

Total RNA extraction

Fresh Thai buffalo duodenum tissue from slaughterhouse approximately 30 mg. was grinded in liquid nitrogen. The total RNA from this tissue was extracted using Nucleospin RNA extraction kit. Aliquot of total RNA was kept at -70°C.

Design oligonucleotide primers, PCR amplification and cloning

Because of the species of buffalo is closely related to cow, thus the buffalo enterokinase light chain gene primers were designed base on the nucleotide sequence of bovine enterokinase in GenBank (NCBI) accession number L19663. First strand cDNA was synthesized using oligodT (Q_T) primer, primer sequence information is shown in table1, and superscriptIII reverse transcriptase. The reaction was carried out at 55°C for 1 hour. PCR amplification was performed using Taq DNA polymerase with primer EK_L 1 and Qo, (Table 1). Primer EK_L 1 corresponding to the part of heavy chain of bovine enterokinase. Primer Qo is the complementary sequence to the 5' end of Q_T primer. PCR cycles were carried out as follow: denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 53°C for 30 second, and extension at 72°C for 1 minute for 35 cycles. Nested PCR was performed with primers EK_L 2 and EK_L 3, (Table 1), which anneal to the N-terminal and C-terminal of bovine enterokinase light chain, respectively. The expected PCR product was excised and purified from agarose gel then ligated into pGEM T easy vector (Promega) by T4 DNA ligase and transformed into *E. coli* DH5α. The clones containing the plasmid with buffalo enterokinase light chain gene inserted were sequenced to determine the nucleotide sequence. The similarity of the sequence which obtained in this step was compared to GenBank databases at NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) using BLAST program (14).

Table 1. Primer sequence information

Primer name	Sequence
Q_T	5' CCAgTgAgCAgAgTgACgAggACTCgAgCTCAAgC$(T)_{17}$ 3'
Q_o	5'CCAgTgAgCAgAgTgACg 3'
EK_L 1	5'gATgTgTgTCAgCTgCTggg 3'
EK_L 2	5' gggAATTCAgATTgTCggAggAAgTgACTC 3'
EK_L 3	5' ggCCgCggATgTAgAAAACTTTgTATCCAC 3'

Results and Discussion

After buffalo enterokinase light chain (EK_L) gene was amplified by RT-PCR and nested PCR technique, the 708 bp of PCR product which was related to bovine EK_L gene was found. The expect size of DNA fragment (Fig.1) was excised and purified from agarose gel then ligated into pGEM T easy vector (Promega). The clones which contained recombinant plasmid were selected. The nucleotide sequence of buffalo EK_L was analyzed according to Sanger's dideoxy method. The result of sequencing analysis and the translated product are shown in Fig.2.

A homology search for buffalo EK_L nucleotides sequence by BLAST program (14) revealed that buffalo EK_L has the most identity with bovine EK_L (98%). The comparison of EK_L nucleotide from the various mammalian species in GenBank was found that the buffalo EK_L gene was 98 %, 89 %, 85 %, 85% and 81% identical with cow, pig, chimpanzee, human and rat, respectively. The cDNA of buffalo EK_L was translated to amino acid sequence. The open reading frame encodes a polypeptide of 235 amino acids residues. The calculated mass and pI (http://www.expasy.org/) are 26.28 kDa and 5.21, respectively. Compare with cow, pig, chimpanzee, human and rat, the buffalo EK_L had 97%, 88%, 85%, 85% and 77% identical amino acid sequence residues, respectively (Fig.3). This result can be concluded that amino acid sequence of EK_L is highly conserved among the various mammalian species. The buffalo EK_L amino acid sequences is almost identical to the previously bovine EK_L reported (Accession number L19663) excepted that only 6 amino acids in buffalo includes Lys 8, Ile 32, Asp 90, Ser 121, Thr 133 and Lys 210 are different. The comparison of amino acid sequence between buffalo and bovine EK_L (accession number L19663) was found that they had the same position of three potential N-glycosylation and nine cysteine residues (Fig.2). By analogy with bovine EK_L, it is predicted that intramolecular disulfide bonding in buffalo EK_L occurs between cysteine pairs 26/42, 126/193, 157/172, 183/211. The remaining cysteine at position 112 is probably involved in single disulfide bridge with the noncatalytic chain (5). The EK_L amino acid sequence alignment indicated that it share the conservation of serine protease sequence motifs among the mammalian species, in particular, the active site residues can be identified as His 41, Asp 92 and Ser 187. The sequence of IVGG of enterokinase N-terminal was conserved in various mammalian species (Fig.3). The previous researches have been reported that the N-terminal amino acid of enteropeptidase is buried into hydrophobic pocket according to the crystal structure. This interaction is believed to play an important role for maintaining the conformation for the catalytic activity. The N-terminal amino acid, Ile, is highly conserved among enteropeptidase light chain in various sources (3). The N-terminal Ile of EK_L is involved in a critical salt bridge within the structure. The three-dimensional structure of EK_L shows that the N-terminal Ile residue is positioned inside the protein for salt bridge where as the C-terminal portion is exposed at outer surface (15).

In conclusion, this research is the first buffalo EK_L gene cloned and sequenced. The nucleotides and amino acids sequence of buffalo EK_L showed highest similarity score when compared with bovine EK_L. This result indicated that buffalo EK_L gene is closely related to bovine EK_L. However, this data information is only the basic knowledge. The works of expression and enzymatic properties studied should be done in the future.

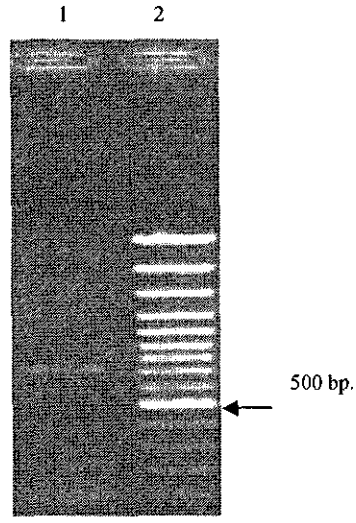


Fig.1 The amplification of buffalo EK_L gene using RT-PCR and nested PCR techniques. The expected nested PCR product was shown in the single band of 708 bp. Lane 1: nested PCR product of buffalo EK_L gene, lane 2: 100 bp. DNA Marker (Fermentas).

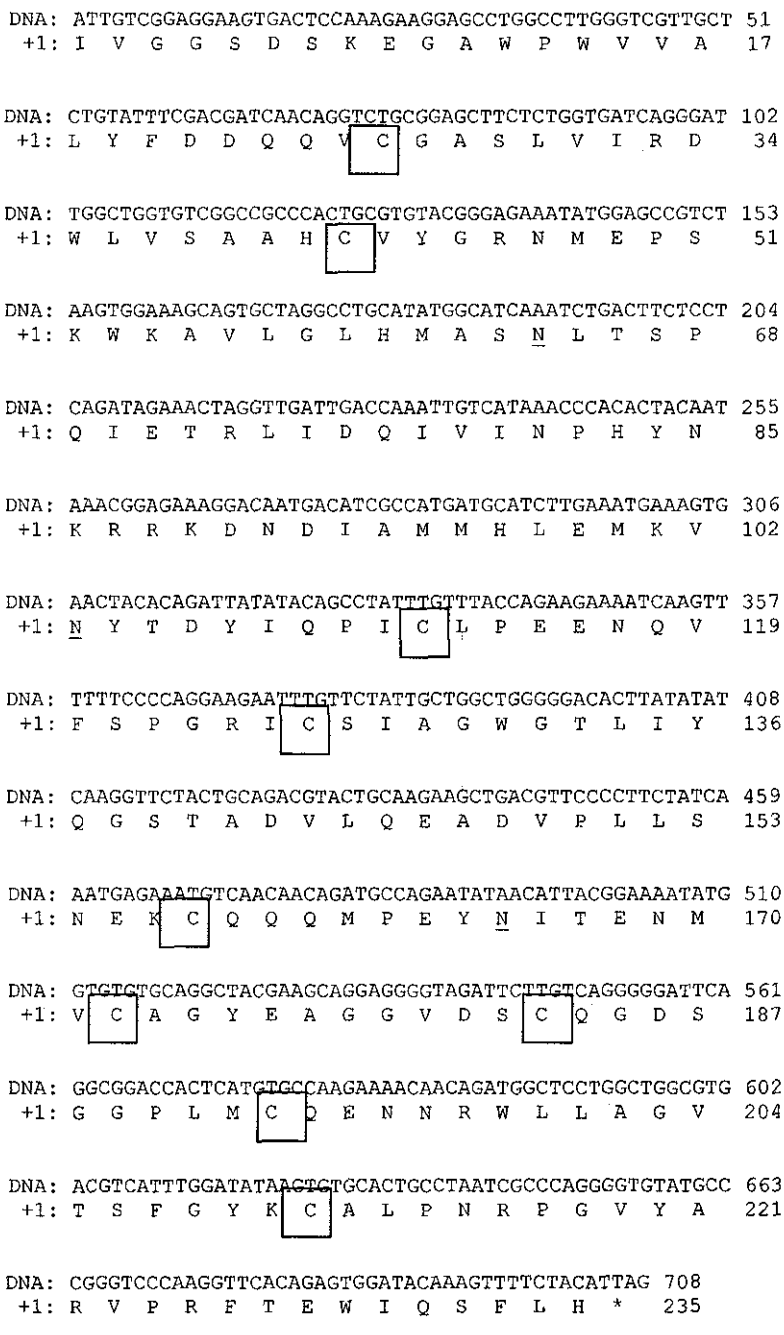


Fig.2 Nucleotide and the predict amino acid sequences of buffalo EK_L gene. The cDNA encoding buffalo EK_L (GenBank accession DQ518426) was translated to amino acid sequence. The same position of nine cysteine residues and three potential N-linked glycosylation were found in buffalo and bovine EK_L. The 9 cysteine residues are boxed. The 3 potential N-linked glycosylation sites are underlined.

Fig.3 Multiple amino acid sequence alignment of EK_L protein between buffalo and the other mammalian species. The translated composite cDNA sequence of buffalo EK_L were aligned with sequence of cow, pig, human, chimpanzee and rat. The active-site histidine, aspartic acid, and serine residues are shown in the bold letters.

Bibliography

(1) Huang H., Y. Zhao, and G. Yi-ru, "Prokaryotic expression of Chinese bovine enterokinase catalytic subunit," ***J. Chin. Med.*** 117 (2) (2004): 286-290.

(2) Suh C. W., S. H. Park, and E. K. Lee, "Covalent immobilization and solid-phase refolding of enterokinase for fusion protein cleavage," ***Process Biochem.*** 40 (5) (2004): 1755-1762.

(3) Song H. W., S. I. Choi, and B. L. Seong, "Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: Effect of N-terminal modification," ***Archives of Biochem. Biophys.*** 400 (1) (2002): 1-6.

(4) McCormick M. and J. Berg, "Recombinant Enterokinase Cleavage of Fusion Protein," [Online]. Available from: *http://www.emdbiosciences.com/docs/NDIS/inno05-001.pdf*.

(5) La Vallie E. R., A. Rehemtulla, L. A. Racie, E. A. DiBlasio, C. Ferenz, K. L. Grant, A. Light, and J. M. McCoy, "Cloning and functional expression of cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase," ***J. Biol. Chem.*** 31(1993): 23311-23317.

(6) Yuan L. D., and Z. C. Hua, "Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*," ***Protein Expr. Purif.*** 25(2002): 300-304.

(7) Collins-Racies L. A., J. M. Mccolgan, K. L. Grant, E. A. DiBlasio-Smith, J. M. McCoy, and E. R. LaVallie, "Production of recombinant catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA," ***Biotechnology*** 13(1995): 982-987.

(8) Yuan X., X. Zheng, D. Lu, D. C. Rubin, C. Y. M. Pung, and J. E. Sadler, "Structure of murine enterokinase (enteropeptidase) and expression in small intestine during development," ***Am. J. Physiol.*** 274(1998): G342-G349.

(9) Matsushima M., M. Ichinose, N. Yahagi, N. Kakei, S. Tsukada, K. Miki, K. Kurokawa, K. Tashiro, K. Shiokawa, K. Shinomiya, H. Umeyama, H. Inoue, T. Takahashi, and K. Takahashi, "Structure characterization of porcine enteropeptidase," ***J. Biol. Chemist.*** 269 (1994): 19976-19982.

(10)Kitomoto Y., X. Yuan, Q. Wu, D. W. McCourt, and J. E. Sadler, "Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains," ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***. 91 (1994): 7588-7592.

(11)Lu D., K. Fütterer, S. Korolev, X. Zheng, K. Tan, G. Waksman, and J. E. Sadler, "Crystal of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide," ***J. Mol. Biol.*** 292 (1999): 361-373.

(12)Kim H. J., Y. H. Kim, Y. H. Roh, B. L. Seong, and C. S. Shin, "Optimization of enterokinase fermentation using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," ***Process Biochem.*** 40 (2005): 717-722.

(13)Gasparian M. E., V. G. Ostapchenko, A. A. Schulga, D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov, "Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*," ***Protein Expr. Purif.*** 31 (2003): 133-139.

(14) Altschul S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," ***Nucleic Acids Res.*** 25 (1997):3389-3402.

(15)Choi I S., H. W. Song, J. W. Moon and B. L. Seong, "Recombinant Enterokinase Light Chain with Affinity Tag: Expression from Saccharomyces cerevisiae and its Utilities in Fusion Protein Technology," ***Bitechnol. Bioeng.***75 (6) (2001): 718-724

ภาคผนวก ค

ได้รับคัดเลือกให้นำเสนอด้วยวาจาในการประชุม The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products

ณ. โรงแรมโฆษะ จ. ขอนแก่น

วันที่ 23-25 พฤษภาคม 2550

Bovine Enterokinase Light Chain Production

Chanida Kupradit[1], Theppanya Charoenrat[2] and Mariena Ketudat-Cairns[*1]

[1]*School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.*

[2]*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasart University, Rangsit Campus, Pathumtani, 12121, Thailand.*

* *ketudat@sut.ac.th*

Enterokinase is one of the most popular protease for cleaving fusion protein because of its high specificity and wide range of reaction conditions. It is a serine protease which cleave at a specific sequence of $(Asp)_4Lys$. In this research the secreted recombinant bovine enterokinase light chain (rEK_L) was produced by *Pichia pastoris* Y11430. Process productions of rEK_L were performed in 2 L fermenter using methanol limited fed-batch technique. The investigation was focused in the effect of induction temperature on the production of rEK_L. The accumulations of rEK_L from both induction temperatures were increased in proportional to the total methanol consumption. The biomass yields ($Y_{x/s}$) at the end of recombinant protein production phase in both high and low induction temperatures were similar with the value of 0.2 $g_{cell}/g_{methanol}$. However, the amount of rEK_L obtained from low induction temperature was more than that from high induction temperature. The results showed that low induction temperature (20°C) did not improve the rEK_L quality but larger amount of rEK_L accumulation was observed. The culture broth from low temperature induction was purified by cation exchange chromatography which obtained 433 mg/L of highly active purify rEK_L. The rEK_L produced from both high induction temperature (30°C) and low induction temperature showed high ability to cleave specific $(Asp)_4Lys$ site of fusion proteins (rice BGlu1-thioredoxin). The cleavage product of fusion protein from commercial rEK_L and rEK_L from this research showed similar pattern on SDS-PAGE .

Keywords: Enterokinase, fusion protein, *Pichia pastoris*

1. Introduction

The use of fusion proteins as a tool for recombinant protein production is well known. Fusing the protein of interest to a well-expressed gene has several advantages include stability, high yield, improve conformational folding and secretion of the expressed product as well as purification and detection (Huang et al., 2004; Liew et al., 2005). To separate the interested protein in the purification step, proteases enzymes have been used to cleave the specific site of the fusion protein. The enterokinase has been shown to have a broad utility in cleaving fusion protein. The enzyme is particularly suitable for this role because of its high degree of specificity, and its tolerance to a wide range of reaction conditions, (La Vallie et al., 1993). It is able to cleave the fusion protein at wide pH values, ranging from 4.5 to 9.5 at temperatures ranging from 4 to 45°C, and in the presence of various detergents and denaturants (Yuan et al., 2002). An important characteristic of this enzyme is that its recognition sequence lies completely on the N-terminal side of the scissile bond, allowing any downstream fusion partner to retain its native N-terminus (Collins-Racies et al., 1995). Bovine enterokinase molecule consists of N-terminal l20 kDa heavy chain and C-terminal 47-kDa light chain. The characteristic of serine protease active site has been found in the smaller subunit. Thus, the smaller (light) chain is the catalytic domains (La Vallie et al., 1993). Therefore, only the enterokinase light chain (EK_L) is interesting to clone and produce recombinantly (Song et al., 2002).

The expression and purification of recombinant bovine enterokinase light chain (rEK_L) from *Escherichia coli*, methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, filamentous fungus *Aspergillus niger* and *Saccharomycis cerevisiae* have been described (Gasparian et al., 2003). Methylotrophic yeast, *P. pastoris*, has been developed as a recombinant protein production system for expression of heterologous protein. It is an eukaryotic host which the expressed recombinant protein can undergo the necessary post-translational processing (Lin Cereghino and Cregg, 2000). It has a highly inducible methanol utilization pathway. In this pathway, methanol oxidase which is the first enzyme of the pathway, accounts for up to 35% of the total protein in cells grown on limited amounts of methanol (Sreekrishna et al., 1997). The most common used approach for heterologous protein expression has been to express the gene of interest under the control of the AOX1 promoter. A characteristic of AOX1 promoter is that it is strongly repressed in cells grown on glycerol, but it is induced over 1000-fold when cells are shifted to a medium containing methanol as a sole carbon source (Damasceno, et al., 2004).

Production of recombinant proteins by *P. pastoris* fermentation is typically carried out in a fed-batch mode, resulting in high cell densities and high levels of recombinant protein production (Zhang et al., 2005). Four stages fermentation protocol involve glycerol batch phase, glycerol fed-batch phase, methanol induction and recombinant protein production phase has been suggested for recombinant protein expression in *P. pastoris* (Jahic et al., 2002). In the glycerol batch phase, the biomass is accumulated but heterologous gene expression is fully repressed (Lin Cereghino and Cregg, 2000). During the glycerol fed-batch phase, limiting glycerol causes a short period to derepress the AOX1 promoter and allows the cells to transition smoothly from glycerol to methanol growth. The third phase is the methanol induction phase, which is initiated by adding very small amount of methanol to adapt the culture to grow on methanol (Higgins and Cregg, 1998). When the culture is adapted to methanol, the recombinant protein production phase is initiated. Under the recombinant protein production phase, the concentration of methanol is low at the

level of growth-rate-limiting but enough to induce the AOX1 promoter (Charoenrat et al., 2005). The dissolve oxygen tension or DOT which is the relative percent of oxygen in the medium can be used to monitor the state of the culture.

To achieve high cell density, the appropriate bioreactor control is very important. The proteolysis degradation is a significant problem in many high cell density cultures. The secretion of the protease to the medium occurred by cell death causes the decrease of recombinant proteins productivity and quality (Jahic et al., 2003). In 2004, Woo et al. reported that a low induction temperature was associated with a low and constant level of dead cells (<2%) during induction phase.

In this work, the secreted rEK_L was produced by *P. pastoris* Y11430. The rEK_L was expressed in 2 L fermenter using four stages fermentation protocol. During the recombinant protein production phase, the effect of induction temperature, 30 and 20°C, on cell growth and the production of rEK_L was investigated.

2. Materials and Methods

2.1 Material

The methylotrophic yeast *P. pastoris* strain Y11430 is a wild-type Mut^+ and His^+. All restriction enzymes were purchased from NEB. The fluorogenic enterokinase substrate for rEK_L assay (Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-β-naphthylamide) was obtained from Sigma. The expression vectors pPICZαB NH8 was modified from pPICZαB from Invitrogen.

2.2 Constructions and expression of rEK_L

The pPICZαB NH8_EK_L was constructed. A cDNA of bovine EK_L was fused inframe to 3' coding α-factor secretion signal sequence of pPICZαB NH8 resulting in the secreted rEK_L contains 8xHis-tagged at N-terminal. The recombinant plasmid was digested with *Sac*I to linearize the plasmid and introduced into *P. pastoris* Y11430 by electroporation method followed the Invitrogen protocol. The colonies containing recombinant plasmid were selected on YPD-zeocin (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose and 100 mg/L of zeocin). The transformants were tested for the expression level of rEK_L by inoculating each transformant into shake flask containing BMGY medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 10 g/L glycerol in 100 mM potassium phosphate buffer pH 6) and cultivated at 30°C, 200 rpm for 48 hours. Then, methanol was added into the culture medium (1-3% (v/v) final concentration) to induce the AOX1 promoter. After 72 h of induction, cell pellets were tested for transcription of EK_L mRNA by RT-PCR technique with gene specific primers.

2.3 rEK_L production in fermenter

Starter culture preparation was started by transferring the chosen colony which was able to express the EK_L mRNA into 250 ml shake flask containing 70 ml BMGY medium. Then, cultivated at 30°C, 200 rpm for 24 h. The fermenter culture was started by inoculation 50 ml of starter into 2 L fermenter containing 950 ml Glycerol

Basal Salt medium (GBS) and 4.35 ml/L PTM1 followed by four stages recombinant protein production (Charoenrat et al., 2005).

First stage was glycerol batch phase which control the cultivation condition at 30°C, pH 5.5, aeration rate 1 vvm, agitation speed 1,000 rpm. During this phase, DOT decreased continuously because *P. pastoris* consumed oxygen for their energy metabolism. The process was run until the sharp increasing in DOT have been detected which presumable mean that the glycerol was completely consumed.

The second stage was glycerol fed-batch phase. Manual feed of glycerol feed medium (GF) (50% glycerol + 12 ml/L PTM1) was applied. The optimum feed rate of GF medium can be calculated base on data reported by Charoenrat et al. (2005) which equal to 16 g/L/h. To obtain similar amount of cell density at the end of this phase as Charoenrat et al. (2005) (approximate 40 g/L) the feed period was 3.85 h.

The third stage was methanol induction. The methanol feed medium (MF) (99% methanol +12 ml/L PTM1) was added into the culture at a very low concentration. For 1 L of initial fermentation volume, 0.633 ml of MF medium was injected into fermenter 4 or 5 times in 3h. At the end of this phase, the *P. pastoris* should be fully adapted to use methanol as substrate, then the recombinant protein production phase was initiated.

The last stage was recombinant protein production phase. The MF medium feed rate was controlled manually by setting up the starting feed rate at a very low speed. In the first 2-3 h of this phase the DOT value was erratic and finally it was stable and constant. For the recombinant protein production at low temperature, the temperature was slowly decreased to 20°C after the DOT was constant and kept under this 20°C condition until the end of process. During this phase, the methanol feed rate depend on the methanol utilization rate of the culture which monitored by DOT. The methanol feed rate was adjusted to increase the recombinant protein expression. When very low DOT was shown, the MF was turned off until the increasing of DOT was observed. Then, MF medium feed rate was adjusted again. The recombinant protein production phase was run until 95 h of induction time.

For the first three phases, the samples were taken at the end of each phase and one time a day for the recombinant protein production phase. The samples were tested for cell growth, enzymatic activity and SDS-PAGE assay.

2.4 Purification of rEK_L by ion exchange chromatography

The culture supernatant was dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer pH 5 and concentrated. The purification process was carried out using FPLC (ÄKTA purifier, Amersham Pharcacia Biotech). The SP column (SP_FF column 5 ml) was equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer pH 5 and then, concentrated crude protein was injected into the sampling loop of FPLC. To remove the unbound fraction, the column was washed with 25 ml of 50 mM sodium acetate buffer pH 5. The recombinant protein was eluted with a gradient of 0-1 M NaCl. The flow-through, wash and elution fractions were automatically detected for protein concentration by measuring the optical density at 280 nm and collected by automatic fraction collecting of the FPLC machine. The protein in each fraction was tested for enzymatic activity and checked the quality of protein by SDS-PAGE. The elution fractions which obtained high rEK_L activity were pooled and concentrated.

2.5 rEK_L analysis

The enterokinase activity was determined using the fluorogenic substrate Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-β-naphthylamide (Gly $(Asp)_4$Lys-β-naphthylamide). One hundred microliter of the crude culture supernatant was added to 2 ml substrate solution (50 μM Gly $(Asp)_4$Lys β-naphthylamide in 70 mM Tris-Cl pH 8 and 10% DMSO) in cuvette then immediately mixed and placed in the cuvette holder of fluorospectrophotometer. Enzymatic activity was measured by an increasing of fluorescence caused by the releasing of β-naphthylamide over one minute interval. One unit is defined as 1 Au (Absorbance fluorescence unit) changes over 1 min interval which is detected at 337 excitation and 420 emissions at room temperature for 10 min.

The activity of rEK_L was also detected by cleavage of fusion protein, rice BGlu1-thioredoxin (Chenchor et al., 2006), which contains the enterokinase recognition sequence in the linker. The cleavages of fusion protein with rEK_L were performed in 50 mM Tris-Cl pH 8 at 30°C for 4 h. The cleavage products were checked with 15% SDS-PAGE. The commercial rEK_L from NEB was used as a positive control. The total protein concentration was measured by Coomassie Plus Protein assay reagent kit (Merk) using BSA as standard protein.

3. Results and Discussion

3.1 Constructions and expression of rEK_L

The cDNA encoding 235 amino acid of bovine EK_L was inserted inframe with the α-factor secretion signal of the expression plasmid pPICZαB NH8 resulting in pPICZαB NH8_EK_L. The recombinant plasmids were sequenced to verify that the junction sequence of the recombinant plasmids were correct. The result of sequencing indicated that the translated amino acid sequence at the junction of N-terminal of the pPICZαB NH8_EK_L is inframe with the polyHis-tagged resulting in rEK_L containing N-terminal 8xHis-tagged. The pPICZαB NH8_EK_L was digested with *Sac*I and transformed into *P. pastoris* Y11430 by electroporation method.

To identify clones which were able to express rEK_L, the EK_L mRNA were detected in shake-flask expression experiment. The mRNA of EK_L was detected from the induced pellet culture carrying pPICZαB NH8_EK_L by RT-PCR with gene specific primers. The results showed the expected PCR product of 700 bp in the colonies which were able to express EK_L mRNA only.

3.2 rEK_L production in fermenter

The rEK_L production was performed using transformant carrying pPICZαB NH8_EK_L which was able to express EK_L mRNA. The rEK_L was expressed under the control of AOX1 promoter which was induced by methanol. The process was initiated by transferring starter from each transformant to 2 L fermenter. Four stages recombinant protein production by *Pichia* in fermenter were applied as described in the material and methods. In glycerol batch phase, approximately 12-17 g of cell dry weight was obtained. The time of glycerol batch phase was approximately 24 h. During this phase, the DOT continuously decreased and when the glycerol was completely consumed, the DOT increased up to 70%. The second phase was initiated

by adding glycerol at a growth-limiting rate (Inan and Meagher, 2001). The glycerol was slowly fed to the fermenter which allows the final concentration of glycerol to be limit. At the end of glycerol fed-batch phase, approximately 40 g/L of cell dry weight was observed which was as high as expected. Then, the methanol induction and recombinant protein production phase begins. During the recombinant protein production phase, the methanol feed rate was controlled manually depend on the ability of methanol consumption of each transformant which monitored by the DOT. The MF medium was continuously fed into the fermenter with slow feed rate during the first 24 h of this phase. The methanol feed rates must be controlled to provide methanol concentration at the proper rate to allow for just enough for protein synthesis but not excess which can causes methanol toxicity (Cino, 1999). The advantage of the continuously methanol feed have been reported that when cell are fed with methanol at a growth-limiting rate, the AOX1 is induced to levels from 3 to 5 times higher than in cells growing in excess of methanol (Cos et al., 2006).

The quality of protein analysis of culture supernatant by SDS-PAGE showed that very few native protein from *P. pastoris* were secreted into the medium and the 63 kDa of secreted rEK_L was shown to be the major band in fermenter culture broth (Fig. 1). The intensity of this band increases over the induction time. The results of total methanol consumption and cell dry weight during the recombinant protein production phase are shown in Fig. 2A and 2B, respectively. The cell dry weight increased with total methanol consumption and different with different induction temperature. The comparison of cell dry weight between high and low induction temperature showed that the cell dry weight obtained from low induction temperature was higher than that from high induction temperature. However, the comparison of biomass yield from both induction temperatures indicated that the biomass yields ($Y_{x/s}$) at the end of the recombinant protein production phase in both induction temperatures were similar with the value of 0.2 $g_{cell}/g_{methanol}$.

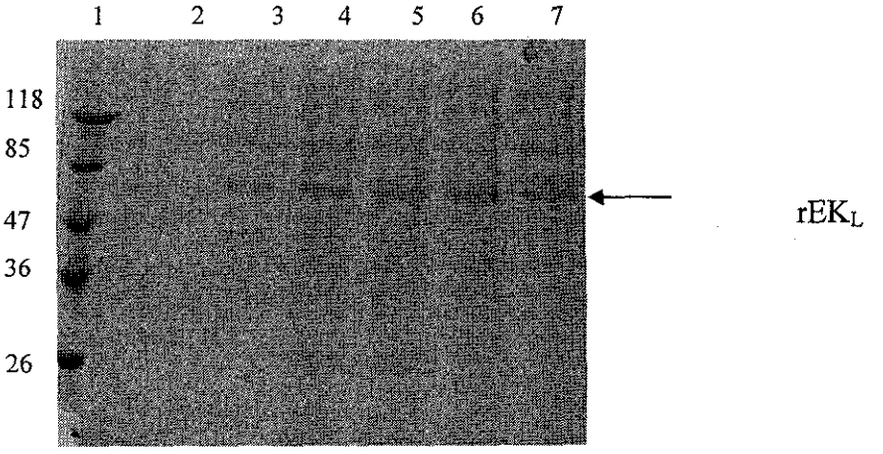


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of crude supernatant. Lane 1: Prestained protein molecular marker (Fermentas); lane 2-3: samples from the end of glycerol batch and glycerol fed-batch phase, respectively; lane 4-7: samples during recombinant production phase at 21, 45, 69 and 92 h of induction time, respectively. The arrow indicates the secreted rEK_L in the culture broth supernatant.

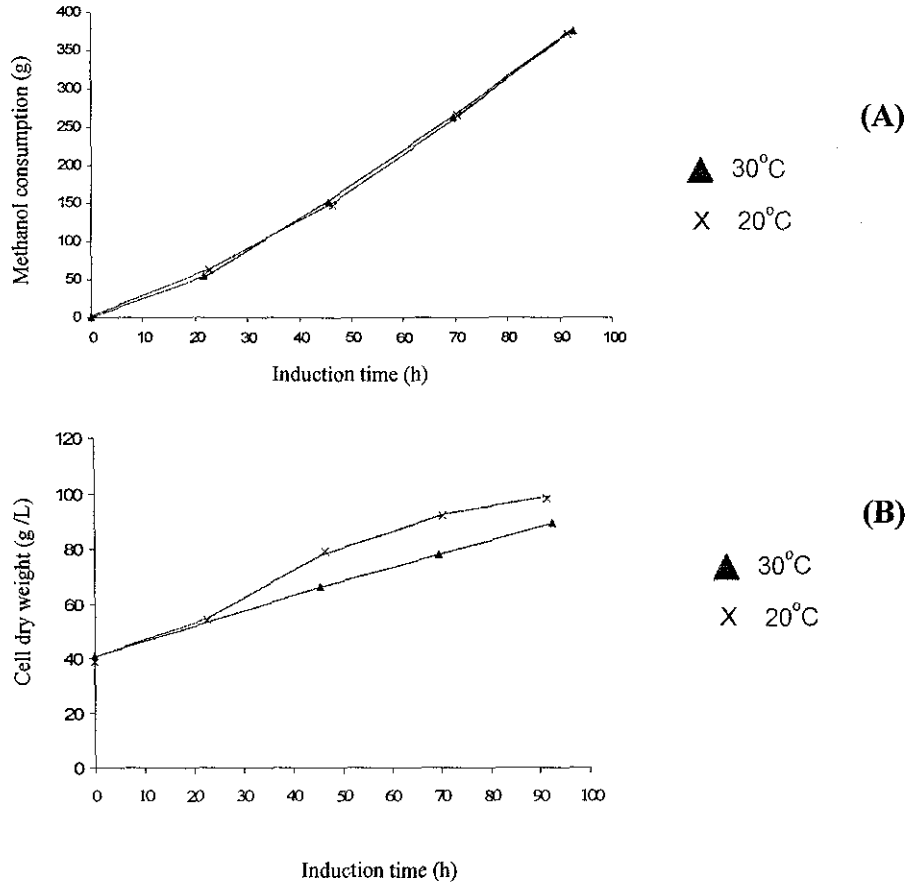


Fig. 2 The relationship of (A) total methanol consumption, (B) cell dry weight at 30 and 20°C and induction time

However, the comparison of specific production yield ($Y_{p/x}$, unit/g cell dry weight) at the end of fermentation process shows that specific production yield from 20°C induction was 9,730 unit/g cell, which was higher than that from 30°C induction of which was 6,475 unit/g cell (Fig.3). This might be due to larger amount of survival cell occurred at low temperature production thus all cells were active and able to utilize the methanol. This made the total enzymatic activity at 20°C production higher than that at 30°C production when equal amount of gram cell were compared.

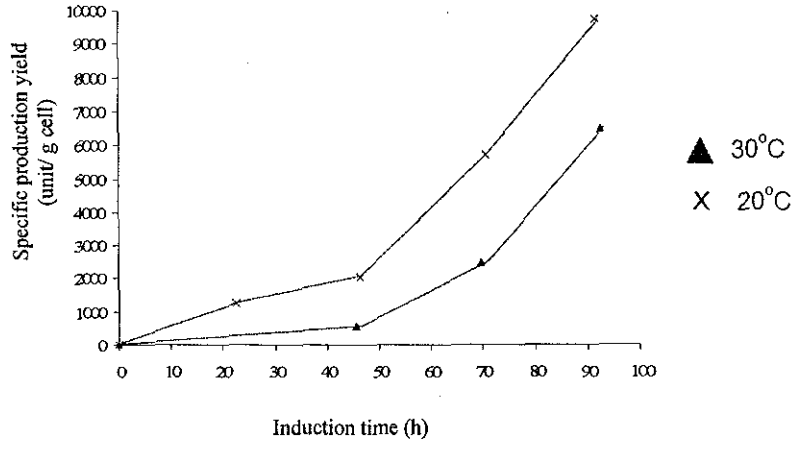


Fig. 3 The relationship of rEK_L unit/g cell at 30 and 20°C and induction time

Low temperature can improve the yield of heterologous protein expression in *P. pastoris* by enhancing protein folding in endoplasmic reticulum and/or by reducing the protease activity in culture medium. Low induction temperature decreased dead cells and reduce protease activity from cell death (Woo et al., 2004). In this research, the total protein concentration obtained from high or low induction temperature was not much different as shown in Fig. 4A. However, the slight decrease of the total protein concentration occurred at high temperature induction after 250 g of MF medium was fed into the fermenter (69 h of induction time). These results may be concluded that at low induction temperature, the cell death and protease from dead cell decreased.

The comparison of specific activity of rEK_L (unit /mg of total protein) shown that rEK_L obtained at low temperature was higher than that at high temperature (Fig. 4B). The quality of rEK_L from both induction temperatures was also considered after purification using ion exchange chromatography.

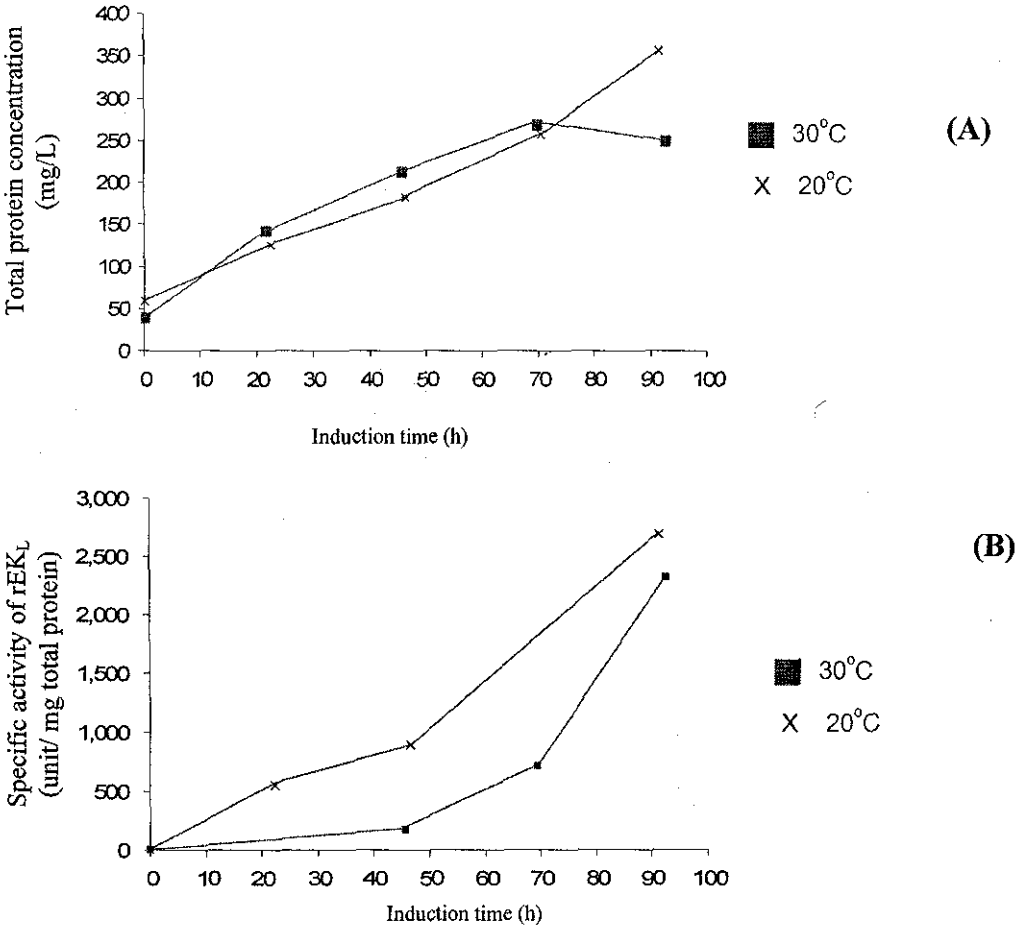


Fig. 4 The relationship between (A) total protein concentrations, (B) Specific activity of rEK_L at 30 °C and 20°C induction temperature and induction time

3.3 Purification of rEK_L by ion exchange chromatography and analysis of ability of rEK_L to cleave the fusion protein

After the rEK_L was purified by cation exchange chromatography, the comparison of purified rEK_L specific activity from both induction temperature systems was shown in Table 1. It showed that the specific activity of purified rEK_L from low induction temperature was lower than that from high induction temperature. These results indicated that low induction temperature can increase amount of rEK_L but can not improve the quality of rEK_L. In the final purification step, 433 mg/L of active purified rEK_L was obtained from low induction temperature. However, the rEK_L obtained from both induction temperature systems showed high ability to cleave a specific $(Asp)_4Lys$ site of fusion proteins (rice BGlu1-thioredoxin) (Fig. 5). The cleavage product of fusion protein by commercial rEK_L and rEK_L from this research showed similar pattern on SDS-PAGE.

Table 1 Recovery of rEK_L from fermenter culture broth induction at 30°C and 20°C.

Induction temperature	After dialysis		Pooled fraction from elution step of SP column	
	Total protein (mg/L)	Specific activity (unit /mg total protein)	Total protein (mg/L)	Specific activity (unit /mg total protein)
20°C	4,973	26,068	433	170,926
30°C	5,118	18,301	224	213,016

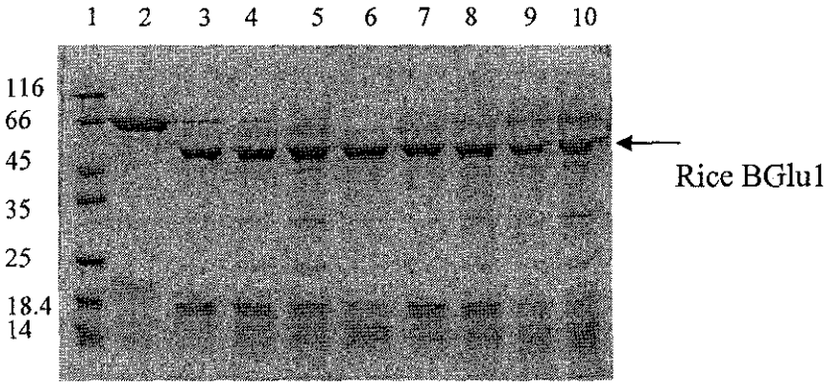


Fig. 5 Cleavage of fusion protein (rice BGlu1-thioredoxin) by the purified rEK_L. The fusion protein was cleaved with purified rEK_L and the commercial rEK_L from NEB in 50 mM Tris-Cl pH 8 for 4 h at 30°C. Lane 1: Protein molecular marker (Fermentas); Lane 2: 6 μg of fusion protein in the reaction buffer; lane 3-5: the incubation of fusion protein with 0.09, 0.3 and 0.7 μg of purified rEK_L from 30°C induction temperature, respectively; Lane 6: the incubation of fusion protein with 0.002 μg of commercial rEK_L from NEB; Lane 7-10: the incubation of fusion protein with 0.2, 0.6, 1.0 and 1.2 μg of purified rEK_L from 20°C induction temperature, respectively. Arrow demonstrates the major cleavage product of rice BGlu1.

4. Conclusion

In conclusions, the increase of active rEK_L was proportional to total methanol consumption and also depend on the induction temperature. The rEK_L obtained from both 20°C and 30°C induction temperature were able to cleave the fusion protein contains EK cleavage site. The effect of low induction temperature on cell growth and rEK_L production showed that low induction temperature increased both cell density and rEK_L productivities, however; it can not improve the quality of rEK_L. After the culture supernatant from the 20°C induction temperature was purified with ion exchange chromatography, 433 mg/L of active rEK_L was obtained. The generated cleavage products which were cleaved with rEK_L obtained in this research and the commercial rEK_L showed similar pattern of cleavage product on SDS-PAGE. Thus, the production of cheaper and highly active rEK_L was fulfilled by fermenter culture using fed-batch cultivation technique.

5. Acknowledgments

This research work was supported by National Research Council Thailand grant through Suranaree University of Technology. All of the work has been performed in School of Biotechnology and Biochemistry's laboratories, Suranaree University of Technology. James Ketudat-Cairns and Rodjana Opassiri are acknowledge for their suggestion and recommendation on several parts of the work.

6. References

Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M., and Enfors, S-V. (2005). Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 27: 399-409.

Chenchor, W., Pengthaisong, S., Yuvaniyama, J., Opassiri, R., Svasti, J., and Ketudat-Cairns, J. R. (2006). Purification, crystallization and preliminary x-ray analysis of rice BGlu1 β-glucosidase with and without 2-deoxy-2-fluoro-β-D-glucosidase. **Acta Cryst.** 1-4.

Cino, J. (1999). High yield protein production from *Pichia pastoris* yeast: A protocol for Benchtop fermentation. **Am. Biotechnol. Lab.** 17: 1-12.

Collins-Racies, L. A., Mccolgan, J. M., Grant, K. L., DiBlasio-Smith, E. A., McCoy, J. M., and LaVallie, E. R. (1995). Production of recombinant catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. **Biotechnology.** 13: 982-987.

Cos, O., RamÓn, R., Montesinos, J. L., and Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoter: A review. **Microbial Cell Factories.** 5-17.

Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H-J, Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J., and Batt, C. A. (2004). An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.** 37: 18-26.

Gasparian, M. E., Ostapchenko, V. G., Schulga, A. A., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2003). Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** 31: 133-139.

Higgins, D. R., and Cregg, J. M. (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. In D. R. Higgins and J. M. Cregg (eds.). ***Pichia* protocol** (pp. 1-15). New Jersey: Humana Press.

Huang, H., Zhao, Y., and Yi-ru, G. (2004). Prokaryotic expression of Chinese bovine enterokinase catalytic subunit. **J. Chin. Med.** 117: 286-290.

Inan M., and Meagher, M. M. (2001). Non-repressing carbon source for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. **J. Biosci. Bioeng**. 92: 585-589.

Jahic, M., Rotticci-Mulder, J. C., Martinelle, M., Hult, K., and Enfors, S-O. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. **Bioprocess Biosyst Eng**. 24: 385-393.

Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A-K., Martinelle, M., Enfors, S-O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **J. Biotechnol**. 102: 45-53.

La Vallie E. R., Rehemtulla, A., Racie, L. A., DiBlasio, E. A., Ferenz, C., Grant, K. L., Light, A., and McCoy, J. M. (1993). Cloning and functional expression of cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. **J. Biol. Chem.** 31: 23311-23317.

Liew, O. W., Chong, J. P. C., Yandle, T. G., and Brennan, S. O. (2005). Preparation of recombinant thioredoxin fused N-terminal proCNP: Analysis of enterokinase cleavage products reveals new enterokinase cleavage sites. **Protein Expr. Purif. 41**: 332-340.

Lin Cereghino, J., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microb. Rev.** 24: 45-66.

Woo, J. H., Liu, Y. Y., Stavrou, S., and Neville, D. M. (2004). Increasing secretion of a bivalent anti-t-cell immonotoxin by *P. pastoris*. **Appl. Environ. Microbiol.** 3370-3376.

Song, H. W., Choi, S. I., and Seong, B. L. (2002). Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: Effect of N-terminal modification, **Archives of Biochem. Biophys**. 400 (1): 1-6.

Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J-T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., and Birkenberger, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**. 190: 55-62.

Yuan, L. D., and Hua, Z. C. (2002). Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** 25: 300-304.

Zhang, W., Sinha, J., Smith, L. A., Inan, M., and Meagher, M. M. (2005). Maximization of production of secreted recombinant protein in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. **Biotechnol. Prog**. 21: 386-393.

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มาริน่า เกตุทัต-คาร์นส์

   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 01120 08 7

   รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

   สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150

   e-mail: ketudat@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

   - พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)
     มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
   - พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology)
     University of California, San Diego, USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   - Molecular Biology
   - Genetic Engineering
   - Recombinant Protein Production
   - Bioinformatics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

   7.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : ไม่มี,

   ผู้ประสานงานชุดโครงการวิจัยโปรตีน, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   7.2 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

   - Enterokinase cloning and production รายงานฉบับนี้
   - Production of Tilapia Transglutaminase
   - Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*
   - Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase

- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl

7.3 **ผู้ร่วมวิจัย**ในโครงการวิจัย 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)

7.4 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว** :

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2 (NIH, USA), แล้วเสร็จ 2537
- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase, แล้วเสร็จ 2541
- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe, แล้วเสร็จ 2543
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, แล้วเสร็จ 2545
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm, แล้วเสร็จ 2546
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, แล้วเสร็จ 2547
- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, แล้วเสร็จ 2548
- The Study for Optimum Production Conditions of Recombinant Proteins in Bioreactor, แล้วเสร็จ 2549
- Production of Tilapia Transglutaminase, แล้วเสร็จ 2549
- Enterokinase cloning and production รายงานฉบับนี้

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., Metheenukul, P., Sujiwattanarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M.**, Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a β-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 β-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., Parnpai, 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, Waverczak 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-Carins, 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-Carins, 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., Imsoonthornraksa, 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 B–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 b-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 β-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, Metheenukul P, Kontong T, **Ketudat-Cairns M**, Toonkool P, Akiyama T, Svasti J, Ketudat Cairns JR (2004) Expanding the repertoire of β-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**, Chantrarangsee 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 β-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) Microsarellite 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) Microsarellite 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)

Manatrinon 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) ชนิดา กุประดิษฐ์

   ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Chanida Kupradit

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน : 3 3099 00883 03 1

3. ตำแหน่งงานปัจจุบัน: ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้:

   สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต.ในเมือง อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
   โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
   e-mail: lego7823@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา:

2546	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2550	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วม.บ.) สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. สาขางานที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ:

   - Fermentation process
   - Recombinant protein production
   - Molecular biology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: -

   7.3 ผู้ร่วมวิจัย : ในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

   - Buffalo enterokinase light chain cloning
   - Bovine enterokinase light chain cloning and production รายงานฉบับนี้

   7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

   - Bovine enterokinase light chain cloning and production รายงานฉบับนี้