รหัสโครงการ SUT1-102-44-12-44

รายงานการวิจัย

การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

Isolation of the chitinase A gene from a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-44-12-44

รายงานการวิจัย

การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

Isolation of the chitinase A gene from a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผศ. ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดยีนไคติเนสจากจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 โดยทำการเตรียมชิ้นของดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3IA ขนาด 3-8 kb และตรวจหายีนไคติเนสโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies เป็นตัวตรวจจับ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไคติเนส ด้วย SDS-PAGE และ immunoblotting ของชิ้นดีเอ็นเอที่นำเข้าสู่พลาสมิด pBluescript II KS(-) และแบคทีเรีย DH5α พบว่าโคลน GC1-GC6 ที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสเป็นองค์ประกอบ การทำแผนที่ดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลาย ๆ ชนิด พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส และพบว่าการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กลงเหลือ 7 กิโลเบส การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE การทำ immunoblotting และการหาแอคติวิตี้โดยใช้ไกลคอลไคติน (glycol-chitin) เป็นสับสเตรทแสดงให้เห็นว่ายีนไคติเนสที่สกัดได้สามารถสร้างโปรตีนขนาด 63 กิโลดัลตัน การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์บางส่วนพบว่า ลำดับนิวคลิโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 ที่ย่อยด้วย *Kpn*I มีความเหมือนกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนสเอ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* คือ 98.3%

Abstract

In this research we describe isolation of a chitinase gene from genomic DNA of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283. The 3-8 kb DNA sizes were prepared by digesting with *Sau*3AI and a chitinase gene was detected immunologically using anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies as a probe. SDS-PAGE and immunoblotting of all the generated DNA fragments, which were cloned into the pBluescript II KS(-) plasmid and transformed into DH5α host cells, suggested that clones GC1-GC6 carried a DNA insert containing a chitinase gene. Analysis of DNA mapping with different restriction enzymes suggested that clone GC6 carried a DNA insert of approx.10 kb. This insert was reduced to 7 kb when digested with *Kpn*I. As revealed by SDS-PAGE, immunoblotting, and chitinase assay on native PAGE using glycol-chitin as substrate, the *Kpn*I-digested DNA could express a 63-kDa protein, which highly corresponded to chitinase A isolated from *V. carchariae*. Partial nucleotide sequencing showed that nucleotide sequence of the isolated gene was 98.3% identical to that of *V. carchariae* chitinase A.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	4
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผลการทดลอง	9
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	17
ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	21
ภาคผนวก ข	23
ประวัติผู้วิจัย	24

สารบัญภาพ

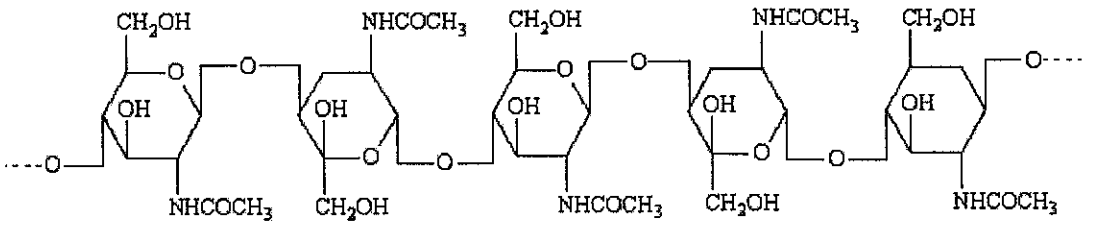
หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ 1
รูปที่ 2 แสดงจีโนมที่สกัดจากเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 9
รูปที่ 3A แสดงขนาดและปริมาณของจีโนมที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
เป็นเวลา 120 นาที ที่ 37°ซ 10
รูปที่ 3B แสดงขนาด genomic DNA (3-8 kb) หลังจากถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
และทำการสกัดด้วย Qiagen DNA Extraction kit..... 11
รูปที่ 4 โคโลนีที่ให้ผลบวกกับ anti-chitinase A antibodies หลังจากทำ colony lift
ครั้งที่ 2..... 12
รูปที่ 5A SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6..... 13
รูปที่ 5B Immunoblotting แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6..... 13
รูปที่ 6A SDS-PAGE แสดงการสร้างโปรตีนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I..... 14
รูปที่ 6B Immunoblotting แสดงการสร้างแอนติเจนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย
*Kpn*I ที่จำเพาะต่อ anti-chitinase A antibodies..... 15
รูปที่ 6C Native PAGE ของโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I ที่ย้อมด้วย glycol chitin..... 15
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของโคลน GC6 กับลำดับนิวคลิโอไทด์
ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อ *V .carchariae*..... 16

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ที่เรียกว่า *N*-acetylglucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกที่ตำแหน่ง β1⟶4 ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ตันต่อปี[1] ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเภสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ

เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่นอาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สามตัวด้วยขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลีเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอนโดไคติเนสให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ หลังจากนั้นโอลิโกเมอร์จะถูกย่อยต่อไปให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ด้วยเอนไซม์เอกโซไคติเนสหรือไคโตไบเอส (chitobiase) ขั้นตอนสุดท้ายคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์เอนอะซิทิลกลูโคลซะมินิเดส (*N*-acetyl glucosaminidase)[2]

เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่างของพืช และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล และสัตว์เคี้ยวเอื้อง หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา[3-5] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอนไซม์นี้มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่[6,7] มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระ ดูกสันหลัง เช่น แมลงและปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น[8-10] นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา[11] ส่วนในพืชเอนไซม์นี้มีส่วนในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช[12,13] และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช[14]

ได้มีการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี Vibrionaceae เป็นแหล่งเอนไซม์ไคติเนสที่สำคัญ ในธรรมชาติแบคทีเรียนี้จะผลิตและหลั่งเอนไซม์ออกจากเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่สะสมหรือเป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น สาหร่ายสีเขียว ไดอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์[15-17] ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแหล่งเอนไซม์ที่สำคัญต่อขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioconversion process) ได้มีการวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาทางโมเลกุลเพื่อศึกษาองค์ประกอบของระบบยีนไคติเนสในแบคทีเรีย[18,19] แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia marcescens*[20] เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานการของเอ็นไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่นการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา[21] การเกษตร เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย เป็นต้นให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ[22] และทาง

เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลิตผลจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการเกษตร[23,24]

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยระดับปริญญาเอกของผู้วิจัยที่ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*[25-26] เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการทดลองขั้นต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตเอนไซม์ไคติเนสมากกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้น แบคทีเรียนี้จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาระบบยีนและโครงสร้างของเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบกับระบบยีนของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการแยกยีนไคติเนสจาก เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* โดยขอบเขตงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นด้วยการเตรียมจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ติดตามด้วยการใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาหรือเทคนิคทาง PCR เพื่อคัดหายีนไคติเนสจากจีโนมที่เตรียมได้ ขั้นตอนสุดท้ายคือการโคลนยีนและการวิเคราะห์หาลำดับของยีนโดยเทคนิค DNA sequencing

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เข้าใจระบบของยีนไคติเนสในเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio*
2. เป็นการเตรียมเอนไซม์ที่จะใช้ศึกษาโครงสร้างสามมิติเพื่อความเข้าใจในกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้อย่างละเอียด
3. มีแนวทางในการวิจัยในอนาคตที่จะมุ่งไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์นี้ให้เหมาะสมเพื่อนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแพทย์ การอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การสกัดจีโนมของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง marine medium, pH 7.6 (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 10 ml โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C ในตู้อบทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 100 ml และทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะเดิมจนเชื้อเจริญเติบโตถึง stationary phase ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดจีโนม[27] ดังขั้นตอนต่อไปนี้

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

2.2. การเตรียมจีโนมของแบคทีเรียขนาด 3-8 kb เพื่อการตรวจหายีนไคติเนส

2.2.1 การเตรียม *Sau*3AI partial digests จาก genomic DNA ของเชื้อ *V. alginolyticus* 283

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

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

ทำการย่อย DNA ด้วยปฏิกิริยาเดียวกันซ้ำกัน 4 ครั้งเพื่อให้ปริมาณ partial digests ที่มากพอ ทำการบ่มปฏิกิริยาในแต่ละหลอดที่ 37°C เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นเติม 10 µl 0.5 M EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยา และทำการเตรียม DNA ที่ถูกย่อยดังนี้

1. ตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol ละลายตะกอน DNA ด้วย 400 µl dH_2O
2. แยก DNA โดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีส โดยใช้ 0.8 % agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 45 นาที
3. ย้อม DNA ด้วย ethidium bromide แล้วตัดเจลช่วงที่มี DNA ขนาด 3-8 kb
4. สกัด DNA จากเจลโดยใช้ DNA purification kit (Qiagen, Germany)
5. ชะ DNA ออกจากเจลด้วย 2 x 60 ml dH_2O
6. ทำการตรวจสอบขนาดของ DNA ที่สกัดได้ว่าถูกต้องหรือไม่ โดย run 2 µl ของ DNA ที่สกัดได้บน 1% agarose gel เทียบกับ DNA มาตรฐานคือ 1 kb ladder marker

2.2.2. การเตรียม pBluescript II KS(-) สำหรับ ligation

ทำการเตรียมพลาสมิด pBluescript II KS(-) โดยใช้ Plasmid Mininprep kit (Qiagen, Germany) และทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดังนี้

ปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย

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

บ่มปฏิกิริยาที่ 37°ซ เป็นเวลา 90 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 µl 0.5 M EDTA และให้ความร้อนที่ 70°ซ นาน 10 นาที

ทำการเตรียมพลาสมิด pBluescript II KS(-) (ภาคผนวก ข) โดยใช้ Plasmid Mininprep Kit (Qiagen, Germnay) และทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดังนี้

ปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย

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

บ่มปฏิกิริยาที่ 37°ซ เป็นเวลา 90 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 µl 0.5 M EDTA และให้ความร้อนที่ 70°ซ นาน 10 นาที แล้ว run 1µl ของพลาสมิดที่เตรียมได้บน 1% agarose gel เทียบหาปริมาณ DNA กับ *Sau*3AI partial digest และประมาณสัดส่วนของดีเอ็นเอกับพลาสมิด

2.2.3 การทำ ligation

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

ปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย

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

บ่มปฏิกิริยาค้างคืนที่ 16°ซ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 10 µl dH_2O แล้วนำ DNA เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี electroporation

หลังจากนั้นทำการ spread เซลล์ปริมาณ 50 ml ลงใน LB agar plate ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ 40 μg/ml X-Gal บ่มเซลล์ที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้น

2.3 การตรวจหายีนไคติเนสโดยวิธี expression screening

ทำตรวจสอบหายีนไคติเนสจาก *Sau3AI* partial digests ที่สร้างขึ้นโดยการทำ colony lift ตามวิธีของ Sedgwick *et. al.*[28] กล่าวคือ ทำการ lift โคโลนีทั้งหมดบน agar plate ด้วย Hyperbond C nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Sweden) ที่ตัดเป็นวงกลมเท่ากับขนาดของ Pestri dish ทำเครื่องหมายบนเมมเบรนเพื่อแสดงตำแหน่งของโคโลนีที่ยกขึ้นมา นำเมมเบรนไปวางบนกระดาษกรองที่ทำให้ชุ่มด้วย 5% (w/v) SDS เพื่อสลายโคโลนีที่อยู่บนเมมเบรน ทำการ fix เซลล์ที่แตกด้วยการอบที่อุณหภูมิ 85°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเมมเบรนมา block ด้วย 5% (w/v) skimmed milk ที่เตรียมใน PBS-T buffer (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 30 นาทีและทำการตรวจหาการโปรตีนไคติเนสที่สร้างขึ้นทางอิมมูโนวิทยาด้วยวิธี ECL (Amersham Bioscience, Sweden) โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies[25] ที่มีอยู่ในสัดส่วน 1:2,500 และใช้ anti-IgG polyclonal antibodies ที่ conjugate กับ horse raddish peroxidase ในสัดส่วน 1:5,000 เป็น secondary antibodies และใช้ chemiluminescence ECL เป็นสับสเตรท ส่วน agar plate ตั้งต้นนำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงเพื่อให้โคโลนีโตเหมือนเดิมและเก็บไว้อ้างอิงหาตำแหน่งของโคโลนีที่ให้ผลบวก

2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนส

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

2.5 การวิเคราะห์ DNA insert และการทำ partial DNA sequencing

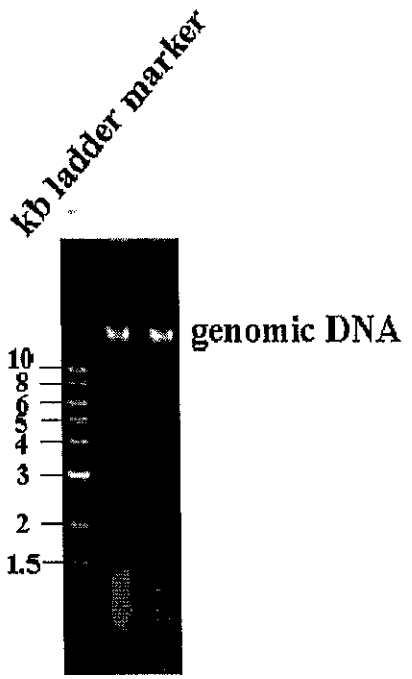
ทำการสกัดริคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากเซลล์ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้ Plasmid Mininprep kit (Qiagen, Germnay) แล้วทำการพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เช่น *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, XbaI, *Sac*I, *Nco*I, *Xho*I, *Not*I, *Sau*3AI และ *Pst*I และแยก DNA บน 1% agarose gel โดยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีส สังเกตขนาดและชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและทำการตรวจสอบยีนไคติเนสโดยเทคนิค PCR โดยใช้ forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการ amplify ยีนไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* [26] ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี automatic sequencing (BSU, Thailand) โดยใช้ universal primers คือ M13 reverse primer และ M13 forward primer เป็น primer ตั้งต้น

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเตรียม *Sau*3AI partial digests จาก genomic DNA ของเชื้อ *V. alginolyticus* 283

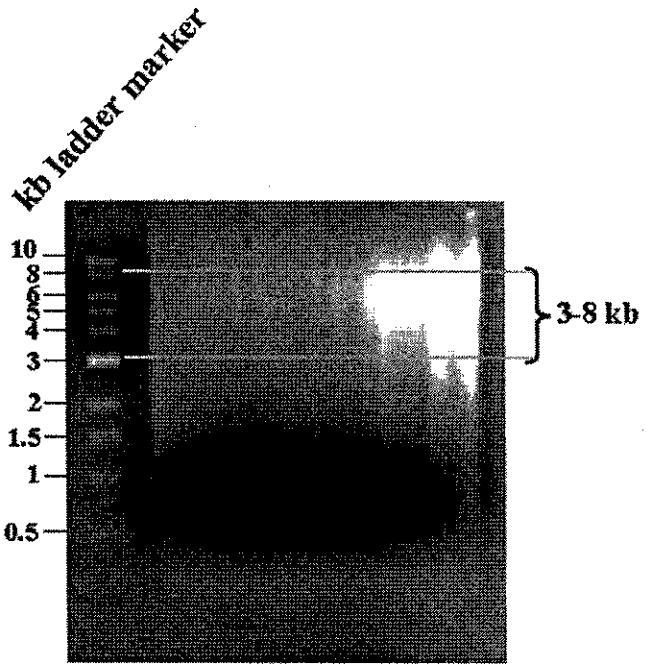
เมื่อทำการเตรียจีโนมของเชื้อ *V. alginolyticus* 283 โดยวิธีของ Ausubel [27] และได้ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 0.8% agarose gel พบว่าจีโนมที่เตรียมได้ที่ได้มีคุณภาพที่ดี (รูปที่ 2) โดยดีเอ็นได้ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นแถบคมชัดไม่แตกหักเป็นเส้นเล็ก ๆ ในระหว่างการเตรียม ปริมาณของดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ 100 ml คือ 1.40 mg



รูปที่ 2 แสดงจีโนมที่สกัดจากเชื้อ *V. alginolyticus* 283

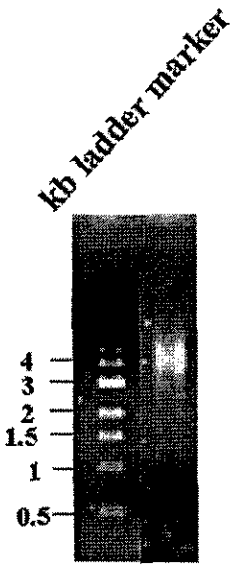
จากจีโนมที่เตรียมได้นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัด *Sau*3AI เอนไซม์นี้มีความสามารถในการตัดแบบจำเพาะที่มี recognition site ที่มีลำดับของนิวคลิโอไทด์ 4 ตัว คือ /GATC ทำให้ตัดชิ้นจีโนมได้ถี่และมีขนาดของ DNA ที่ถูกย่อยจากชิ้นเล็กมาก ๆ ไปถึงชิ้นใหญ่มาก ๆ เมื่อให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 30 mU/µl และ

เวลาในย่อย 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าขนาดของ DNA ที่ถูกย่อยมีปริมาณมากอยู่ในช่วง 3-8 kb ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ (รูปที่ 3A)



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

ทำการตัดเจลภายใต้แสง UV ในช่วงดีเอ็นเอ ขนาด 3-8 kb แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Qiagen DNA Extraction kit และทำตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้อีกครั้งหนึ่งโดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 1% agarose gel พบว่าได้ดีเอ็นเอ ตามขนาดที่ต้องการพร้อม (รูปที่ 3B) ที่จะนำไปสร้างเป็น DNA library



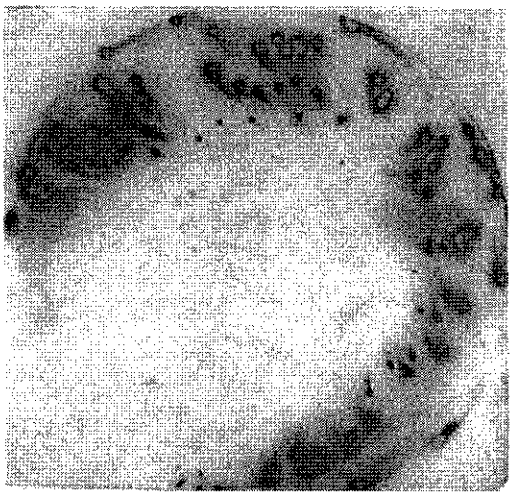
รูปที่ 3B แสดงขนาด genomic DNA (3-8 kb) หลังจากถูกย่อยด้วย *Sau*3AI และทำการสกัดด้วย Qiagen DNA Extraction kit

3.2 การตรวจหาโคลนที่มียีนไคติเนสจาก DNA library

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

จากโคโลนีที่ขึ้นบน LB/amp agar plate ได้ทำ colony lift (ดูการทดลองที่ 2.3) ตามด้วย immunoblotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies พบว่ามี 1 โคโลนีใน plate ที่มีอัตราส่วนของ DNA กับพลาสมิดเป็น 10:1 ที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี จึงทำการเขี่ยโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงใน 10 ml

อาหารเหลว LB/amp และทำการ spread เชื้อลงบน LB/amp agar plate ที่มี 0.5 mM IPTG ทำการบ่มเชื้อที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วทำ colony lift ครั้งที่ 2 โดยใช้ anti-chitinase A antibodies เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่งดังรูปที่ 4

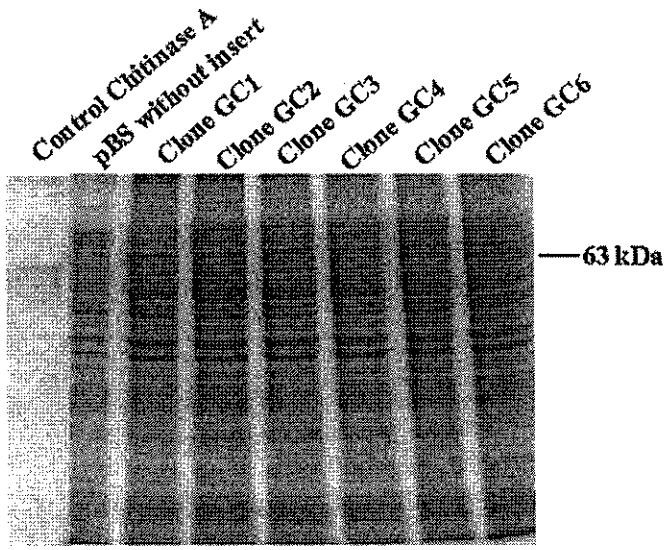


รูปที่ 4 โคโลนีที่ให้ผลบวกกับ anti-chitinase A antibodies หลังจากทำ colony lift ครั้งที่ 2

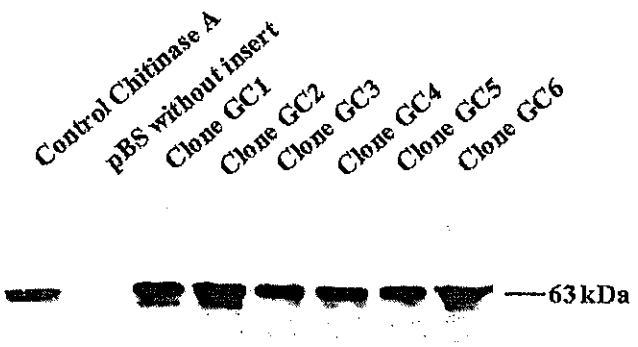
การให้ผลบวกกับแอนติบอดีแสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมียีนไคติเนสที่สามารถแสดงออกและสร้างแอนติเจนที่จับกับ anti-chitinase antibodies ได้คือโปรตีนไคติเนส

3.3 การตรวจสอบเบื้องต้นการแสดงออกของยีนไคติเนส

ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน 6 โคลนคือ GC1-GC6 โดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/amp ที่มี 0.5 mM IPTG ทำการบ่มเชื้อที่ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 3 x SDS loading buffer ไปสลายเซลล์หลังจากนั้นปั่นกำจัดส่วนที่เป็นเศษเซลล์ทิ้งไป นำส่วนใส 15 µl มาวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE โดย เพื่อทำการศึกษาการผลิตโปรตีนไคติเนสในหลอดทดลองที่วิเคราะห์จาก crude protein โดยการย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue (รูปที่ 5A) และการทำ immunoblotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A antibodies (รูปที่ 5B) พบว่าโคลนทั้ง 6 สามารถผลิตโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีโดยขนาดของริคอมบิแนนท์ที่สร้างขึ้นคือ ประมาณ 63 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของเอนไซม์ไคติเนส เอ ที่สร้างโดยเชื้อ *V. carchariae*



รูปที่ 5A SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6

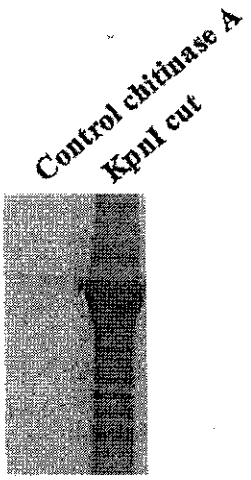


รูปที่ 5B Immunoblotting แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6

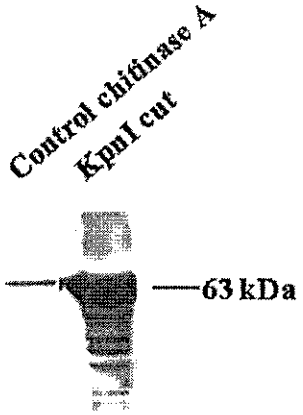
3.4 การวิเคราะห์ DNA insert

จากโคลนทั้ง 6 ที่สามารถผลิตโปรตีนไคได้เลือกโคลนที่ 6 มาทำการสกัดพลาสมิดและทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ (ดูการวิธีการทดลองที่ 2 .5) ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*Iทำให้ทราบว่า DNA insert มีขนาดประมาณ 10 kb และดีเอ็นเอนี้ถูกตัดให้ได้ขนาดย่อยต่างๆ เมื่อใช้เอนไซม์ตัวอื่น และพบว่าเอนไซม์ *Kpn*I สามารถตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงเป็น 10 kb จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอขนาด 10 kb ดังกล่าวและทำให้บริสุทธิ์ตามด้วยการ religate ตัวเองและนำไป religated plasmid ไป transform เข้า *E. coli* DH5α และบ่มเซลล์ 16 ชั่วโมงบน LB/amp agar plateพบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นแสดงว่าดีเอ็นเอขนาด 10 kb ที่ตัดด้วย *Kpn*I ประกอบด้วยพลาสมิด pBluescript (3 kb) และชิ้นดีเอ็นของแบคทีเรียอีก 7 kb

ขั้นตอนต่อมาได้ทดสอบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสที่แสดงออกได้หรือไม่ จึงได้ทำการเตรียมเซลล์ดังการทดลองที่ 2.4 โดยการเลี้ยงเซลล์ในปริมาตร 10 ml ในอาหารเหลวแล้วสลายเซลล์ด้วย 3x SDS loading buffer ทำการแยก crude protein ด้วยวิธี SDS-PAGE และทำ immunoblotting พบว่าโคลนดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนไคติเนสที่มีขนาด 63 kDa ดังรูปที่ 6A และ 6B

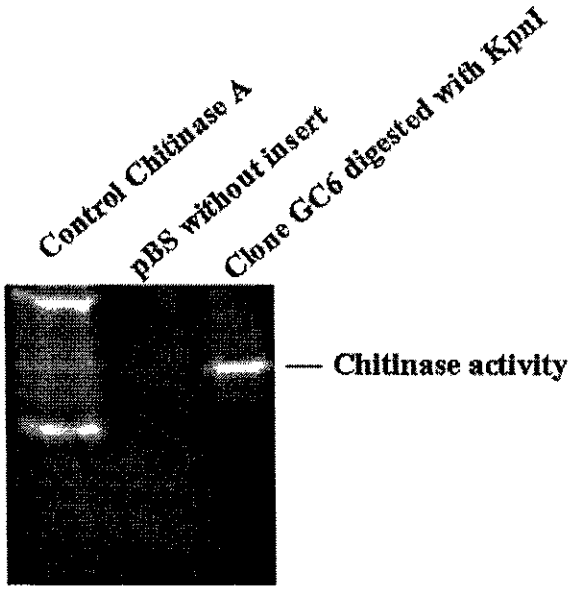


รูปที่ 6A SDS-PAGE แสดงการสร้างโปรตีนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I



รูปที่ 6B Immunoblotting แสดงการสร้างแอนติเจนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I ที่จำเพาะต่อ anti-chitinase A antibodies

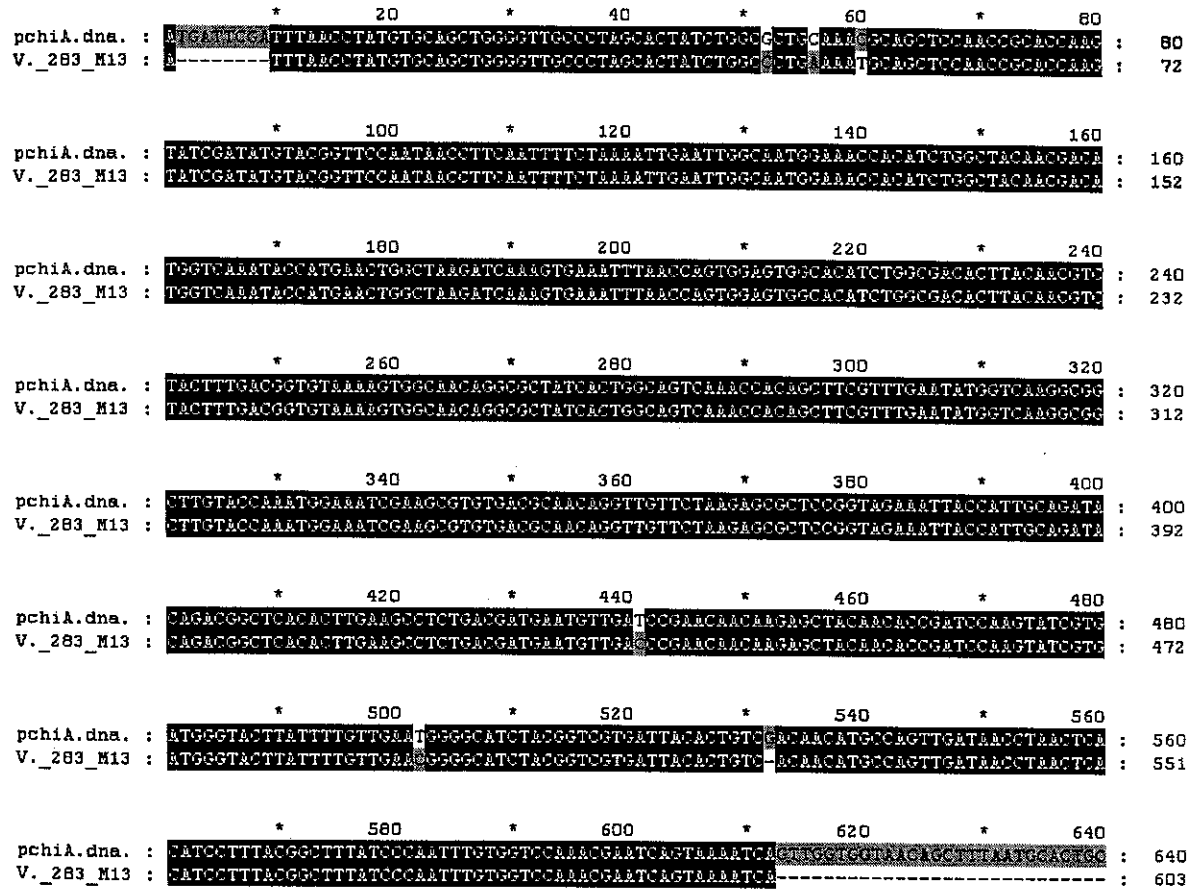
จากผลการทดลองที่ได้จากการย้อมไคติเนสแอคติวิตี้บน native PAGE (รูปที่ 6C) พบว่าโคลนขนาด 7 kb ที่ตัดด้วย *Kpn*I มีความสามารถในการสลาย glycol-chitin ได้ จากการทดลองดังกล่าวแสดงว่าโคลนดังกล่าวมียีนไคติเนสที่แสดงออกได้



รูปที่ 6C Native PAGE ของโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I ที่ย้อมด้วย glycol chitin

3.5 การทำ partial DNA sequencing

ได้ทำการสกัดพลาสมิดของโคลน GC6 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7 kb ที่ย่อยด้วย *Kpn*I และส่งไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ โดยใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์ 2 ตัวคือ M13 forward และ M13 reverse เป็น primer ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่าส่วนของ DNA insert มีลำดับของนิวคลิโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ที่สกัดจากเชื้อ *V. carchariae* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 98.3% (รูปที่ 7) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโคลนที่ได้มียีนไคติเนส อยู่



รูปที่ 7 แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของโคลน GC6 เทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อ *V. carchariae*

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 และได้เตรียม genomic library ของดีเอ็นเอดังกล่าวโดยการตัดดีเอ็นเอให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3*AI และเลือกสกัดเฉพาะ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้ขนาด 3-8 kb แล้วทำการโคลนชิ้น DNA นี้เข้าไปในพลาสมิด pBluescript II KS(-) และ transform รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไปใน *E. coli* DH5α จากนั้นได้ทำการตรวจสอบหายีนไคติเนสจากจำนวนโคลนทั้งหมดโดยวิธี immuno screening พบว่ามีโคลนที่ให้ผลบวกกับ anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies หลังจากทำ secondary screening ได้เลือกสุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีมา 6 โคลนคือ โคลน GC1-GC6 มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนส ผลของ SDS-PAGE และ immunoblotting แสดงให้เห็นว่าโคลนทั้งหมดที่เลือกมาศึกษามีชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสเป็นองค์ประกอบ จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลาย ๆ ตัว พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 มีขนาดประมาณ 10 kb และพบว่าการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดเล็กลงเหลือ 7 kb ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE การทำ immunoblotting และการหาแอคติวิตี้โดยใช้ glycol chitin เป็นสับสเตรทแสดงให้เห็นว่า DNA insert มียีนไคติเนสที่สร้างโปรตีนขนาด 63 kDa จากการทำ partial DNA sequencing พบว่าลำดับนิวคลิโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 ที่ย่อยด้วย *Kpn*I มีความเหมือนกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* คือ 98.3% [26]

ข้อเสนอแนะ

การทดลองในลำดับต่อไปคือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนไคติเนสที่แยกได้และการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์และความสามารถในการย่อยไคตินของเอนไซม์ไคติเนสดังกล่าว

บรรณานุกรม

1. Gooday, G.W. (1994) In C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312
2. Davis, B., and Eveleigh, D.E. (1984) In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.
3. Papavizas, C.G. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54
4. Cabib, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 59-101
5. Kuranda, M., and Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 266, 19758-19767
6. Srivastava, A.K., Defago, G., and Boller, T. (1985) Secretion of chitinase by *Aphanocladium album*, a hyperparasite of wheat rust. *Experientia.* 41, 1612-1613
7. Sivan, A., and Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum. J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682
8. Jeuniaux C. (1966) Chitinases. *Methods Enzymol.* 8, 644-650
9. Okutani, K. (1977) Chitin digestion in the digestive tract of fish. *Proc. First Int. Confer. Chitin/Chitosan*, Boston MA (*USA*), April[11th-13th], 1977, 554-562
10. Okutani, K., Sawada, T., and Kimata, M. (1967) Studies of chitinolytic enzymes in aquatic animals -VI. The chitinolytic enzyme present in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33, 952-955
11. Spindler-Barth, M. (1993) Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines. In Chitin Enzymology (Muzzarelli, R.A.A., ed.), European Chitin Society, *Italy*, 75-82
12. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., and Vogeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31
13. Pleban, S., Chernin, L., and Chet, I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus. Lett Appl. Microbiol.* 25, 284-288
14. de Jong, A.J., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerchhove, J., van Kammen, A., de Vries, S.C. (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4, 425-433

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และสับสเตรท

Marine Medium 2216E

Per litre:

To 950 ml of filtered, aged sea water add:

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

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

CTAB/NaCl solution

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

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

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

Colloidal chitin

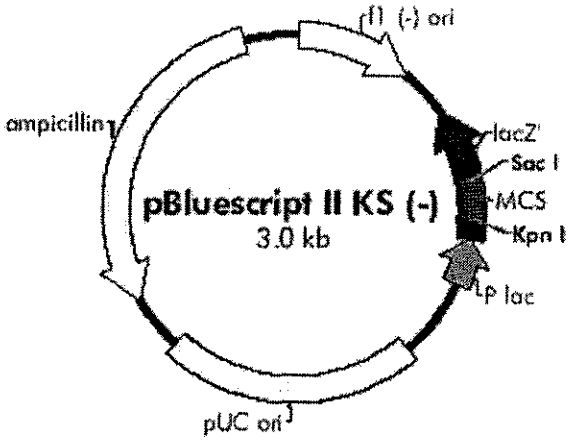
Chitin powder from crab shells (5 g) was added slowly into 60 ml of concentrated HCl and left at 4 °C overnight with vigorous stirring. The mixture was added to 2 litres of ice-cold 95% ethanol with rapid stirring and kept overnight at 25 °C. The precipitant was collected by centrifugation at 5000 *g*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

Glycol chitin

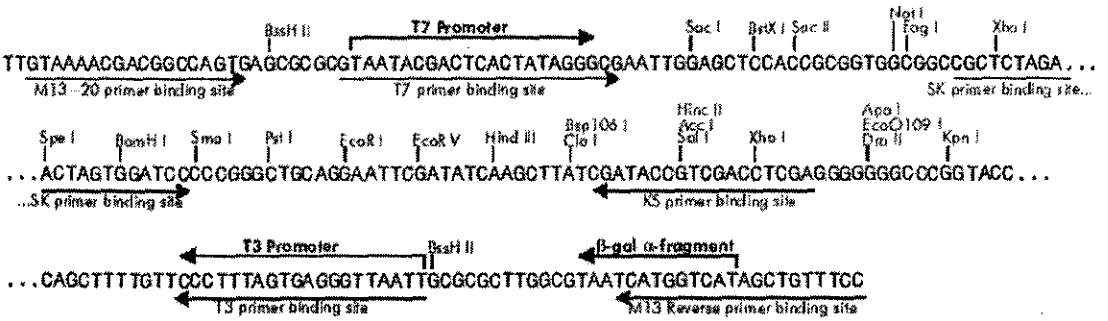
Five grams of glycol chitosan was dissolved in 100 mL of 10% acetic acid by grinding in a mortar, and the viscous solution was allowed to stand overnight at 22°C. Methanol was added, and the solution was vacuum filtrated through a Whatman No. 4 filter paper. The filtrate was transferred into a beaker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

ภาคผนวก ข

แผนที่พลาสมิด pBluescript II KS(-)



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



ประวัตินักวิจัย

Name Assistant Professor Dr. Wipa Suginta

Affiliation School of Biochemistry, Institute of science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand

Tel: +66 44 22 4313

E-mail wipa@ccs.sut.ac.th

Education

1995-1998 Ph.D. (Biochemistry) Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Edinburgh University, U.K.

1990-1993 M.Sc. (Biochemistry) Dept. of Biochemistry, Mahidol University, Thailand

1986- 1990 B.Sc. (Genetics) Dept. of Botany and Genetics, Chulalongkorn University, Thailand

Experiences

1994-Present **Lecturer in Biochemistry**

School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University, Thailand

1999-2000 **Postdoctoral Research Associate**

Research Title: Cloning, Expression, and Functional Characterisation of Membrane Proteins in the Intracellular Chloride Ion Channel (CLIC) Family.

1995-1998 **Ph.D. Biochemistry**

Thesis Title: Molecular Biological Studies of Chitinase A from the Marine Bacterium, *Vibrio carchariae*

1990-1993 **M.Sc. Biochemistry**

Thesis Title: Purification and Characterisation of β-galactosidase from Thai Jute, *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altisima*

Fellowships/Awards

2004 The General Travel Grant award from the Biochemical Society for a short visit to Germany between March31-May15, 2004.

2003 The DAAD award for a Study Visit to Germany between April1-May15, 2003

1999-2000	Wellcome Trust Fellowship for Postdoctoral research.
1995-1998	Royal Thai Government Scholarship for Ph.D. degree
1994	The Outstanding Poster Presentation Award on the 11th FAOBMB Symposium, 15-18 November, 1994, Bangkok, Thailand
1990-1993	Suranaree University of Technology Scholarship for M.Sc. degree
1989	Most Improving in Study Award for undergraduate study

Meetings/Conferences

1. Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel, ***Poster Presentation***, the 15th Annual Meeting of the Thai Society for biotechnology, February3-6, 2004. P5.
2. Expression, purification, and preliminarily structural analysis of chitinase A *from Vibrio carchariae*, ***Poster Presentation***, the 15th Annual Meeting of the Thai Society for biotechnology, February3-6, 2004. P164.
3. Molecular actions of Chitinase A in chitin utilization as revealed by HPLC/MS. ***Invited Speaker***, The Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22-23, 2003
4. Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, ***Poster Presentation***, The Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22-23, 2003
5. Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. ***Invited Speaker***, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29-30, 2002.
6. *C*-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, ***Poster Presentation***, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29-30, 2002
7. How to prepare your protein for crystallography. ***Invited Speaker***. 1st Southeast Asia Protein Crystallography Workshop, Nakhon Ratchasima, Thailand, May 21-27, 2001.

8. The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins, ***Poster Presentation***, FASEB Summer Research conference on Molecular Biophysics of Cellular Membrane, Vermont, USA. September 2000.
9. Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*: isolation, nucleotide sequencing, and homology modeling of 3-D structure, ***Poster Presentation***, The 44th Biophysics Meeting, New Orleans, USA. February 21-27, 2000.
10. Attended the Annual Meeting of Scottish Protein Structural Group, Edinburgh, U.K, 1996
11. Attended the Annual Meeting of Scottish Protein Structural Group, Stirling, U.K December 1995.
12. Possible use of glycosidase enzymes from thai plant seeds for oligosaccharide synthesis, **Poster Presentation**, Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function, and applications, The 11th FAOBMB Symposium, Bangkok, Thailand, November 15-18, 1994.
13. β-galactosidase from Thai jute: purification and characterization, **Poster Presentation**, Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function, and applications, The 11th FAOBMB Symposium, Bangkok, Thailand, November 15-18, 1994.

List of Publications

1. **Suginta, W.,** and Svasti, J. (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, pp. 256-260
2. **Suginta, W.**, and Svasti, M.R.J. (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima. J. Sci. Soc. Thailand.* 21, 183-186.
3. Surarit, R., Svasti, M.R. J., Srisomsap, C., **Suginta, W.**, Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P. and Benjavongkulchai, E. (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok., pp. 251-255.
4. Svasti, J., Srisomsap, C., Surarit, R., Benjavongkulchai, E., **Suginta, W.**, Khunyoshyeng, S., Champattanachai, V., Nilwarangkoon, S., Rungvirayudx, S. (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In *Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press pp 249-257.

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

6. **Suginta W.**, Estibeiro, P., Rigden, D.J., and Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J.* P417A

7. **Suginta, W.**, and Ashley, R.H. (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference)*, P57.

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

9. Sun, Q., McDonald, A., **Suginta, W.**, and Ashley, R.H. (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans.* A112.

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

11. **Suginta, W.**, Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, H., Duncan, R.R., Svasti, J., and Fothergill-Gilmore, L.A. (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180.

12. Siritapetawee, J., Prinz, H., Krittanai, C., and **Suginta, W.** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* In Press.

13. **Suginta, W.**, Svasti J., and Prinz H. Enzymatic properties of a family 18 chitinase, chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI-MS. (In preparation).