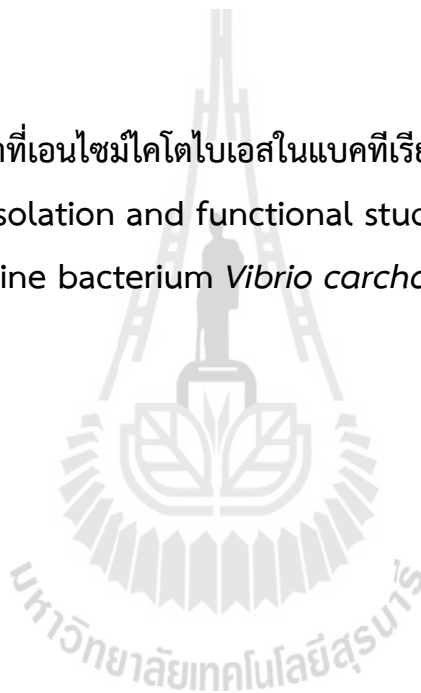




## รายงานการวิจัย

การแยกยีนและการศึกษาหน้าที่เอนไซม์ไคโตไบเอสในแบคทีเรียในทะเล *Vibrio carchariae*  
Gene isolation and functional study of chitinase from a  
marine bacterium *Vibrio carchariae*



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

การแยกยีนและการศึกษาหน้าที่เอนไซม์ไคโตไบเอสในแบคทีเรียในทะเล *Vibrio carchariae*  
Gene isolation and functional study of chitinase from a  
marine bacterium *Vibrio carchariae*

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2552-2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2556

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

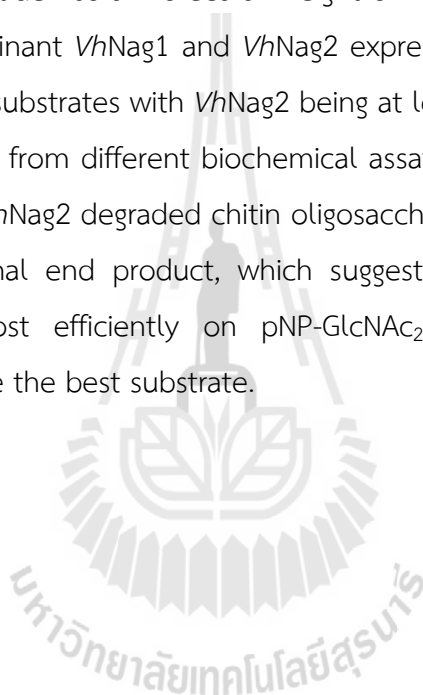
31 กรกฎาคม พ.ศ. 2555

## บทคัดย่อ

เอนไซม์โคโตไบเอสหรือเอ็น อะซิทิลกลูโคซามินิเดสจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 3 หรือแฟมิลี 20 ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองแฟมิลีมีความแตกต่างกันทั้งลำดับของกรดอะมิโนและกลไกในการเร่งปฏิกิริยา ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการแยกเอ็นของเอนไซม์เอ็น อะซิทิลกลูโคซามินิเดสแฟมิลี GH-20 สองตัวคือ VhNag1 และ VhNag2 จากจีโนมของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (ชื่อเดิมคือ *V. carchariae*) สายพันธุ์ 650 ต่อมาได้ทำการโคลนยีนทั้งสองเข้า pQE60 expression vector ซึ่งสามารถทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *E. coli* เจ้าน้ำสายพันธุ์ M15 ได้ การวิเคราะห์หาลายโพลีเพปไทด์ของ VhNag1 มีขนาด 88,849 Da มีค่า pI เท่ากับ 4.9 มีค่า pH optimum ในช่วงกว้างคือ 6.5-7.5 ส่วนสายโพลีเพปไทด์ของ VhNag2 polypeptide มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 73,143 Da มีค่า pI เท่ากับ 5.4 และมีค่า pH optimum เท่ากับ 7.0 การศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทพบว่ารีคอมบิแนนท์ VhNag1 และ VhNag2 ที่ถูกผลิตโดย *E. coli* สามารถย่อยโคตินสับสเตรทได้ทุกชนิด แต่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์ VhNag2 ดีกว่าเอนไซม์ VhNag1 อย่างน้อย 10 เท่า ผลการทดสอบทางชีวเคมีและข้อมูลทางจลนพลศาสตร์พบว่าเอนไซม์ VhNag2 สามารถย่อยโคตินโอลิโกแซคคาไรด์แบบเป็นลำดับและให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น GlcNAc ซึ่งบ่งบอกว่า VhNag2 มีลักษณะเป็น exolytic enzyme นอกจากผลการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสับสเตรทต่าง ๆ พบว่า VhNag2 ย่อย pNP-GlcNAc<sub>2</sub> ได้ดีที่สุด ส่วนเมื่อเทียบกับโคตินโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกันพบว่าโคโตเตตระโอสเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดของ VhNag2

## ABSTRACT

Chitobiases or  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases are classified into glycosyl hydrolases family 3 (GH-3) or family 20 (GH-20), both are different in sequence identity and mode of enzyme action. In this study, two genes corresponding to GH-20 GlcNAcase homologues (namely *VhNag1* and *VhNag2*) were successfully isolated from the genome of *V. harveyi* (formerly classified as *V. carchariae*) type strain 650. Both genes were cloned into pQE50 expression vector, which could be expressed in *E. coli* M15 host cells. The *VhNag1* polypeptide has a molecular weight of 88,849 Da, a pI of 4.9 and a broad range of pH optimum from 6.5 to 7.5, whereas the *VhNag2* polypeptide has a molecular weight of 73,143 Da, a pI of 5.4 and a pH optimum of 7.0. The recombinant *VhNag1* and *VhNag2* expressed by *E. coli* were found to degrade all the tested chitin substrates with *VhNag2* being at least ten fold more active than *VhNag1*. The results obtained from different biochemical assays and kinetic characterization consistently suggested that *VhNag2* degraded chitin oligosaccharides in a sequential manner, generating GlcNAc as the final end product, which suggests that *VhNag2* is an exolytic enzyme. *VhNag2* acts most efficiently on pNP-GlcNAc<sub>2</sub>. For chitin oligosaccharide, chitotetraose was found to be the best substrate.



## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	13
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	23
ข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม	24
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	28
ภาคผนวก ข	31
ภาคผนวก ค	33
ประวัติผู้วิจัย	34



## สารบัญญภาพ

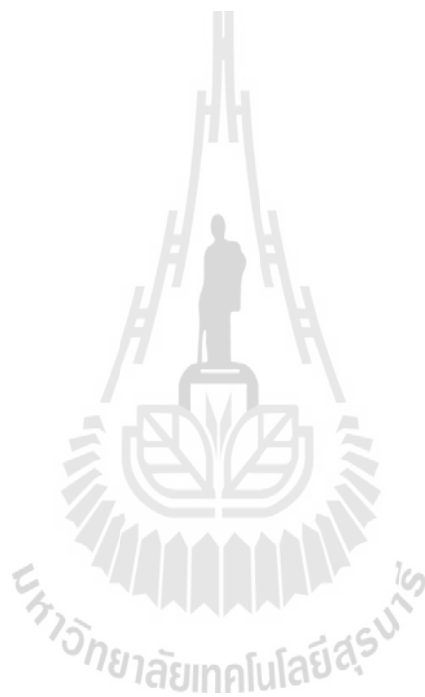
	หน้า
รูปที่ 1.1 แสดงพื้นที่บนแผนที่โลกที่มีการระบาดของโรค Melioidosis	1
รูปที่ 1.2 โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่มีพอรินเป็นองค์ประกอบ	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้างสามมิติทั่วไปของพอรินจาก <i>E. coli</i>	3
รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ BLM set-up สำหรับการศึกษาคูสมบัติของพอรินของเดี่ยว	9
รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ cuvette ที่ assembled แล้วด้วย Teflon foil และ working electrode ด้าน CIS และ reference electrode ด้าน TRANS	9
รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>BpsOmp38</i> ที่ผลิตโดย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3)Omp8 ด้วย 12% SDS-PAGE gel	13
รูปที่ 3.2 การเหนี่ยวนำการเกิด three-stepwise closure ของช่องพอริน <i>BpsOmp38</i> ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ +150 mV	14
รูปที่ 3.3 โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ 4 กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาอัตราการ การนำเข้าผ่านช่องพอริน <i>BpsOmp38</i>	15
รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะในกลุ่มต่าง ๆ ต่อ ion current blockage ของช่องเดี่ยวพอริน <i>BpsOmp38</i> ที่ความเข้มข้น 10 mM และที่ applied potential เท่ากับ +100 mV สำหรับ penicillin G ceftazidime และ ertapenem ส่วนความเข้มข้นของ norfloxacin ที่ใช้คือ 1 mM และค่า applied potential เท่ากับ -100 mV ในอิลเลคโตรไลต์ 1M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0	16
รูปที่ 3.5 การ translocation ของ ertapenem ผ่านช่อง <i>BpsOmp</i> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	17
รูปที่ 3.6 การหาค่า dwell time (T) ของ ertapenem ผ่านช่อง <i>BpsOmp</i> จากการ fit กราฟด้วย simple exponential decay algorithm	18
รูปที่ 3.7 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการ translocate ของ ertapenem ผ่านช่องพอริน <i>BpsOmp</i>	19
รูปที่ 3.8 กราฟแสดงการหาค่า energy barrier ของการจับและการปล่อยของ ertapenem	20
รูปที่ 3.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ <i>BpsOmp</i> กับ multiple templates ของพอริน OmpF OmpC Omp32 Omp36 และ PorB	21
รูปที่ 3.10 แสดงโครงสร้างจำลองโมเลกุลของ <i>BpsOmp</i>	22

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1. อัตราการเกิด translocation ของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ข้ามช่องพอริน  
*BpsOmp38*

หน้า

17



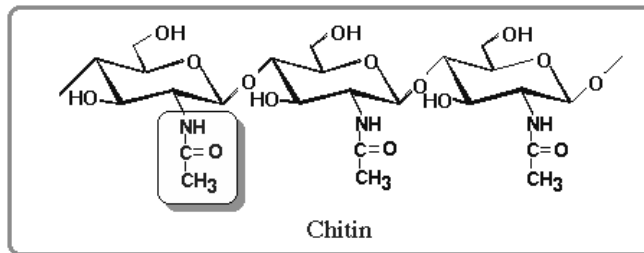


## บทที่ 1

### บทนำ

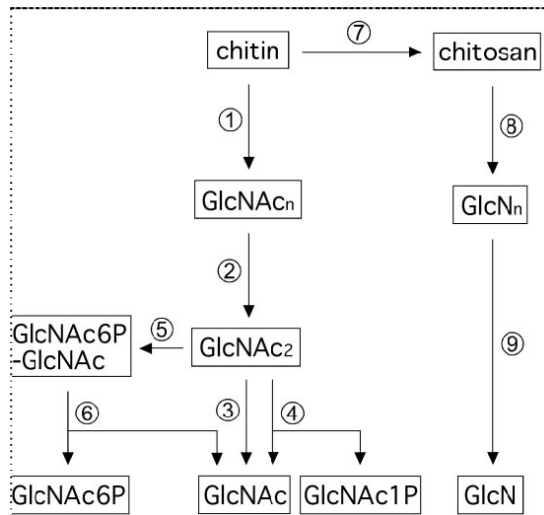
#### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ของ *N*-acetylglucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\beta 1 \rightarrow 4$  ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ (แหล่งที่มา: [members.tripod.com/~Dalwoo/structure.gif](http://members.tripod.com/~Dalwoo/structure.gif))

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง  $10^{10}$  ถึง  $10^{11}$  ตันต่อปี [1] ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตรกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม การผลิตและแปรรูปอาหาร เช่น อาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรม การเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิบัติการเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิบัติการย่อยสลายในธรรมชาติ การย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดด้วยขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลีเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (EC3.2.1.14) ให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ให้ผลิตผลสุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ขั้นตอนต่อมาคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์ไคโตไบเอส หรือ เอ็น-อะซิติล-บีต้า-ดี-กลูโคซามิไนด์ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิไนด์ไฮโดรเลส (chitinase/*N*-acetylglucosamino hydrolase)[2] รูปที่ 1.2 แสดงวิธีการสลายไคตินที่ต้องการเอนไซม์ไคตินเนสและไคโตไบเอส [3]



รูปที่ 1.2 วิธีสลายไคติน

เอนไซม์ 1, endochitinase; 2, exochitinase; 3, Chitobiase; 4, GlcNAc<sub>2</sub> phosphorylase; 5, GlcNAc<sub>2</sub> phosphotransferase system; 6, 6-phospho-D-glucosaminidase; 7, chitin deacetylase; 8, chitosanase; and 9, GlcNase (แหล่งที่มา: Tanaka et al. J Bact. 2003, p5175-5181)

เอนไซม์ไคโตไบเอส (EC 3.2.1.52) เป็นจัดเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบมากทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต [4] เอนไซม์นี้ทำหน้าที่สลายไคตินสายสั้น เช่นไคโตไบเอส (GlcNAc)<sub>2</sub> จากปลายด้านอนริตวิซซ์ให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) [5] การจับกลุ่มเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลสโดยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของโครงสร้างสามมิติและลำดับของกรดอะมิโนตามหลักการของ Henrisat และ Romeu [6] พบว่าเอนไซม์ไคโตไบเอสอยู่ในกลุ่มของไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลี 20 โครงสร้างหน่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีลักษณะเป็น (α/β)<sub>8</sub> TIM barrel และเร่งปฏิกิริยาแบบ retaining mechanism เหมือนเอนไซม์ไคติเนสในแฟมิลี 18 [7] รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการสกัดเอนไซม์ไคโตไบเอสจากตัวคน [8] การศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวใช้ไคโตไบเอสเป็นสับสเตรทแต่ไม่ย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ เช่น pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> การศึกษาต่อมาพบว่าเอนไซม์นี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของ glucoaminoglycan ในผู้ป่วยที่เป็นโรค Tay-Sachs disease และ Sandhoff's disease [9]

ส่วนการศึกษาในแบคทีเรียพบว่าเอนไซม์ไคโตไบเอสถูกผลิตขึ้นเพื่อการย่อยสลายไคตินสายสั้น ๆ ให้เป็น GlcNAc ที่จะถูกเมทาบอลิซซ์ต่อไปเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้แก่เซลล์แบคทีเรีย งานวิจัยของ Tew et al [10] ได้ทำการแยกยีนไคโตไบเอสหรือเอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสจาก *Serratia marcescens* และทำการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในระบบ *E. coli* ส่วนการศึกษาอื่น ๆ ได้แก่ไคโตไบเอสที่สกัดจากเชื้อ *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 [3] พบว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อวิถีเมทาบอลิซึมของไคตินของเซลล์แบคทีเรียซึ่งแสดงในรูปที่ 2

ในส่วนของแบคทีเรียในทะเลได้มีรายงานการโคลนยีนไคโตไบเอสจากเชื้อสองสายพันธุ์คือ

*Alteromonas sp.* O-7 [11] และ *V. harveyi* [12] ข้อมูลจากการสกัดยีนและการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V. harveyi* N-acetyl glucosaminidases ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ในไซโตพลาสซึมที่มีอย่างน้อยสามไอโซฟอร์ม และส่วนเอนไซม์ที่พบโดย Soto-Gil RW & Zyskind JW [12] เป็นไอโซฟอร์มที่มีขนาด 98 กิโลดาลตัน ฝังอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและมีคุณสมบัติเป็นไลโปโปรตีน

ในปี 2006 กลุ่มวิจัยของ Aronson [13] จากมหาวิทยาลัยอะลาบามาได้ศึกษากลไกการจับของเอนไซม์โคโตไบเอสกับสับสเตรทโดยเทคนิคทาง quantitative HPLC พบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์โคโตไบเอสของยูคาริโอต (ไก่และคน) ประกอบด้วยบริเวณจับย่อย ๆ 3 บริเวณคือ -2 -1 และ +1 โดยพันธะที่ถูกย่อย เชื่อมระหว่างน้ำตาล -1 และ +1

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของผู้วิจัยที่ได้มีมาก่อนหน้านี้คือการคัดเลือกหาเอนไซม์โคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเลและพบว่าเชื้อ *V. harveyi* (*V. carchariae*) สายพันธุ์ 650 และเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 สามารถผลิตโคตินเนสออกมาในปริมาณมากในสภาวะถูกกระตุ้นด้วยโคติน ที่ใส่ลงไปในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบเหลวและแข็ง [14,15] การศึกษาคุณสมบัติการสลายสับสเตรทพบว่าเอนไซม์ที่สกัดจาก *V. carchariae* มีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดโคตินเนส (endochitinase) ที่อยู่ในแฟมิลี 18 ทำหน้าที่สลายโคตินโพลีเมอร์ให้ได้ผลิตผลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ และผลิตผลสุดท้ายที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายคือโคโตไบโอส [16,17] ในการศึกษาครั้งนี้คือการสกัดยีนและการศึกษาการทำงานของเอนไซม์โคโตไบเอส ถือเป็นงานวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยโคตินเนส โดยผลการวิจัยจะนำไปสู่แนวทางการพัฒนากระบวนการย่อยสลายโคตินโดยปฏิกิริยาการสลายแบบสมบูรณ์

## 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทำการตรวจหายีนเอนไซม์โคโตไบเอสในเชื้อ *Vibrio carchariae*
2. เพื่อทำการแยกและโคลนยีนโคโตไบเอสจากเชื้อ *V. carchariae*
3. เพื่อทำการแสดงออกของยีนโคโตไบเอสที่ได้ในระบบ *E. coli*
4. เพื่อทำการศึกษาคูณสมบัติทางเอนไซม์ของรีคอมบิแนนท์โคโตไบเอส

## 1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มที่การตรวจหายีนโคโตไบเอสในจีโนมของแบคทีเรีย *V. carchariae* ขั้นตอนนี้ทำโดยอาศัยข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งของยีนโคโตไบเอสที่ได้จาก genome project ของเชื้อ *V. harveyi* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI หลังจากนั้นจะทำการสกัดยีนโคโตไบเอสโดยเทคนิคทาง PCR และทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของยีนที่ได้ การทดลองในขั้นตอนต่อมาคือการโคลนยีนเข้าไปในพลาสมิดในกลุ่ม pQE60 หรือ pET และการศึกษาการแสดงออกของยีนโคโตไบเอสในระบบ *E. coli* ต่อจากนั้นจะทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โคโตไบเอสและการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะ ขั้นตอนที่สุดท้ายคือการศึกษาคุณสมบัติในการใช้โคตินสับสเตรทและการวิเคราะห์รูปแบบของการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์โดยเทคนิคทาง thin layer chromatography และ quantitative HPLC

#### 1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 4 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยเนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีใครได้ดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 1.5 ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และการเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์หรือการบรรยายในที่ประชุมระดับชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง
2. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดน้อยมากในสถาบันการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศไทย
3. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแนวทางการพัฒนากระบวนการสลายไคตินโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งจะมุ่งเป้าไปยังกระบวนการผลิตที่มีให้คุณค่าทางการค้าสูง

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานภาครัฐที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเกษตร เช่น กรมพัฒนาส่งเสริมการเกษตร
2. หน่วยงานภาคอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดมลภาวะที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม
3. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเนื่องจากงานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการสอนการวิจัยและการผลิตบัณฑิตศึกษาในระดับปริญญาโทและเอกของสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิทยาศาสตร์ของม. เทคโนโลยีสุรนารี

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1. การแยกยีนและการโคลนยีน

##### - การสกัดจีโนมของ *Vibrio harveyi*

เชื้อโคลนเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ 650 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง marine medium, pH 7.6 (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณ 10 ml โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ในตู้บ่มทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาณ 100 ml และทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะเดิมจนเชื้อเจริญเติบโตถึง stationary phase ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดจีโนม 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 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติมน้ำ 1.8 ml 5M NaCl เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมน้ำ 1.5 ml สารละลาย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)/NaCl เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 20 นาที
4. เติมน้ำ chloroform/isoamyl alcohol (24:1 โดยปริมาตร) ในปริมาตรที่เท่ากับสายละลายตัวอย่าง กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ แล้วปั่นแยกชั้น ดีเอ็นเอ ออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. ค่อย ๆ ดูดสารละลายชั้นบนที่มีจีโนมของแบคทีเรียอยู่ลงในหลอดทดลองใหม่ โดยใช้ micropipette ขนาด 1.0 ml ที่ตัดปลายออก
6. เติมน้ำ 0.6 volumes isopropanol ลงในสายละลายดีเอ็นเอ กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็นสีขาวเป็นก้อนพันกันอยู่
7. ค่อย ๆ ใช้ Pasteur pipette ที่ปลายงอเป็นตะขอปิด เขี่ยตะกอนดีเอ็นเอ ขึ้นมาใส่หลอดทดลองใหม่ที่มี 1 ml 70% (v/v) ethanol
8. ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายเอธานอล ออก คว่ำหลอดทดลองพอให้ดีเอ็นเอแห้งแบบหมาด ๆ แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 4 ml buffer ที่งสารละลายดีเอ็นเอ ค้างคืนไว้ที่ 4 °C
9. วัดค่า  $A_{260}/A_{280}$  เพื่อหาความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้

##### - การโคลนยีน

ข้อมูลจากฐานข้อมูล CAZY database (<http://www.cazy.org/>) แสดงยีนที่สร้างเอนไซม์ไคโตไบเอสหรือเอ็น อะซิทิกลูโคซามินเดสในจีโนมของ *V. harveyi* สายพันธุ์ *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1116 BB120 ที่มี open reading frame (ORF) จำนวน 3 frame คือ

VIBHAR\_01265 VIBHAR\_06345 และ VIBHAR\_03430 จึงทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ ORF ทั้งสามเป็นต้นแบบเพื่อทำการแยกยีน จากจีโนมของเชื้อเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์คือ *V. harveyi* สายพันธุ์ 650 แล้วทำการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR ผล PCR ให้ขึ้นของ DNA เพียงสองชนิดคือ ยีน VhNag1 และ VhNag2 ส่วนชิ้นดีเอ็นเอสำหรับ VIBHAR\_03430 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ ต่อมานำชิ้น PCR ของ VhNag1 และ VhNag3 ที่ได้นำมาโคลนเข้าไปใน pGEM-T cloning vector แล้วถ่ายโคลนที่ได้ไปยังพลาสมิด pQE60 แล้วทำการตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สกัดได้ด้วยการทำ automatic DNA sequencing โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์กับ BioService Unit (Bangkok) ลำดับของคู่ primer ที่ใช้มีดังนี้

### **VhNag1 gene**

Forward primer: 5'-AGGATCCGGGCAGGGTAAAATC-3'

Reverse primer: 5'-AGGAGATCTATCGGTAAAGTGTGAAG-3'

### **VhNag2 gene**

Forward primer: 5'-AGGGATCCGAATACCGTGTTGATTTA-3'

Reverse primer: 5'-AATAGATCTCTCCACGGTTTACGGTA-3'

ส่วนที่ขีดเส้นใต้ของ forward primer แสดง BamHI site และของ reverse primer แสดง BglII site ตามลำดับ ชิ้นดีเอ็นเอของ VhNag1 ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 2.3 kb และของ VhNag2 มีขนาด 1.9 kb หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งสองเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  และ *E. coli* M15 (pREP) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

## **2.2. การศึกษาแสดงออกใน *E. coli* และการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์**

หลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนด้วยการทำ automated DNA sequencing (Bio Service Unit, ประเทศไทย) และวิเคราะห์ข้อมูลของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมใน DNASTAR package (DNASTAR, Inc., Madison, USA) ทำการ express รีคอมบิแนนท์โคติเนส เอ ดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB/100  $\mu$ g/ml ampicillin ที่ 30 $^{\circ}$ C จนได้ OD<sub>600</sub> ประมาณ 0.6 ทำการ induce เซลล์ด้วย 0.5 mM isopropyl thio-beta-D-galactoside (IPTG) ที่ 20 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 $^{\circ}$ C ทำการละลายเซลล์ด้วย 40 ml ของ lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) และ 1.0 mg/ml lysozyme ต่อจากนั้นทำการสลายเซลล์ด้วยเทคนิค ultrasonication แล้วปั่นแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้หลังการปั่นตกตะกอนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะโดยใช้ Ni-NTA agarose เป็นตัวจับ หลังจากล้างคอลัมน์ด้วย 5 mM imidazole ตามด้วย 10 mM imidazole

ทำการชะเอาโปรตีนที่จับอยู่กับ  $\text{Ni}^{2+}$  ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli [18] ทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีนโคติเนสที่ตำแหน่ง 63 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (Mr 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's [19] แล้วนำโปรตีนมาศึกษาหน้าที่ โครงสร้าง หรือเก็บที่  $-30^{\circ}\text{C}$  ใน 15% (w/v) กลีเซอรอล จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

### 2.3. การวัดปริมาณเอนไซม์และการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรท

หาแอกติวิตี้ของเอนไซม์ปีต้า-เอ็นอะซิลกลูโคซามินิเดสโดยใช้ pNP-GlcNAc เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาใน 96-well microtiter plate ทำปฏิกิริยา 100- $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย 10  $\mu\text{l}$  เอนไซม์ 500  $\mu\text{M}$  pNP-GlcNAc และ 100 mM phosphate buffer, pH 7.0 ที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3.0 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (100  $\mu\text{l}$ ) แล้ววัดหาปริมาณ p-nitrophenol (pNP) ที่ค่าดูดกลืนแสง  $A_{405}$  แล้วคำนวณความเข้มข้นของ pNP ด้วยกราฟมาตรฐานของ pNP ที่สร้างขึ้นในช่วง 0-20 nmol

ส่วนการหาแอกติวิตี้ของเอนไซม์โดยใช้โคโตโอลิติกแซคคารไรด์เป็นสับสเตรททำในปฏิกิริยาปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ประกอบด้วย 250  $\mu\text{M}$  สับสเตรท ( $\text{GlcNAc}_{2-6}$ ) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ที่มีปริมาณเอนไซม์ 200  $\mu\text{g}$  enzyme ทำการบ่มปฏิกิริยาที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 min แล้วทำการต้มปฏิกิริยาที่  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 min ทำปฏิกิริยาทั้งหมดต่อด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ตามวิธีของ Miller [20] ตรวจสอบสีของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยการวัดที่ค่า 540 nm และคำนวณหาปริมาณผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากกราฟมาตรฐาน ของ GlcNAc (0-500 nmol) สำหรับ colloidal chitin ทำปฏิกิริยาที่ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  ที่มี 5% (w/v) colloidal chitin ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 และ 200  $\mu\text{g}$  enzyme หลังจากทำการบ่มและหยุดปฏิกิริยาเหมือนของโคโตโอลิโกแซคคารไรด์ แล้วปั่นตกตะกอนโคตินที่เหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000  $\times\text{g}$  เป็นเวลา 1 min นำส่วน supernatant ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  มาวัดหาค่าสีดังกล่าวข้างต้น ค่า specific activity คำนวณจากปริมาตรสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ 1 nmol pNP หรือ reducing/min/mg enz

### 2.4. การศึกษาผลของ pH

ตรวจหาผลของ pH ของเอนไซม์ A VhNag1 และ VhNag2 โดยวิธี pNP assay ดังอธิบายในข้อ 2.3 แต่บ่มปฏิกิริยาในสารละลาย pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ pH 2.5 ถึง 9.0 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine's sodium phosphate-citric acid - KCl buffer system [21]

### 2.5. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

ทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เอนไซม์ปีต้า-เอ็นอะซิลกลูโคซามินิเดสโดยวิธี colorimetric assay เหมือนข้อ 2.3 แต่ใช้ปริมาณสับสเตรทตั้งแต่ 0-500  $\mu\text{M}$  pNP-GlcNAc ใน

สารละลาย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ทำการคำนวณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ เช่นค่า  $K_m$  ค่า  $V_{max}$  ค่า  $k_{cat}$  จากการทดลองซ้ำสามครั้ง โดยใช้ฟังก์ชัน nonlinear regression จากโปรแกรม GraphPad Prism ส่วนการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ด้วยน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และ colloidal chitin ใช้วิธี DNS assay โดยใช้น้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ความเข้มข้น 0-500  $\mu\text{M}$  ส่วน colloidal chitin ใช้ความเข้มข้น 0 to 5.0 % (w/v) ทำการวัดผลผลิตน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาล GlcNAc ที่ช่วง 0-1.75  $\mu\text{mol}$  และหาค่าทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ จาก ฟังก์ชัน non-linear regression

## 2.6. การตรวจหาสารผลิตภัณฑ์ของการย่อยไคตินโดยวิธี Thin Layer Chromatography

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสลายโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคติน ของเอนไซม์บีต้า-เอ็นอะซิลกลูโคซามินิเดส ในปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ที่มี 2.5 mM สับสเตอร์ท และ 5  $\mu\text{g}$  เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 0, 5, 10, 15, 30, 180 นาที และ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  นำไปวิเคราะห์หาผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยวิธี thin layer chromatography หรือ TLC โดยใช้แผ่น silica TLC plate ขนาด 7.0 ซม × 10.0 ซม เป็น stationary phase และมี mobile phase ที่ประกอบด้วย n-butanol:methanol: 30% ammonia solution:H<sub>2</sub>O (10:8:4:2) (v/v) หลังจากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลาย aniline–diphenylamine reagent แล้วอบที่ 120 °C เป็นเวลา 5–10 นาที

## 2.7. การตรวจหาสารผลิตภัณฑ์ของการย่อยไคตินโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography

ทำการบ่มปฏิกิริยาในปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย 1.25 mM chitin oligosaccharide (GlcNAc<sub>2-6</sub>) ที่มี 38  $\mu\text{M}$  VhNag2 และ 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 ที่ 30°C ที่เวลาต่าง ๆ กันคือ 5, 10, 15, 30, 60, 120 และ 180 min ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 12  $\mu\text{l}$  0.1M NaOH แล้วนำปฏิกิริยาปริมาตร 12  $\mu\text{l}$  ถ่ายลงในหลอดขนาด 200  $\mu\text{l}$  นำไปแช่ลงใน liquid N<sub>2</sub> ทันที แล้วเก็บปฏิกิริยาไว้ที่ -20°C ทำการหาปริมาณสารน้ำตาลผลผลิตที่ได้โดยการฉีดปฏิกิริยาปริมาตร 15  $\mu\text{l}$  เข้าไปคอลัมน์ TSK-GEL G2000PW (7.5 × 600 mm, Tosoh) ที่ต่อกับระบบ Hitachi L-7000 HPLC system (Hitachi Koki Co., Ltd, Tokyo) เพื่อทำการแยกสารตามหลักการ gel filtration chromatography โดยใช้ distilled water เป็นตัวชะ ใช้ flow rate เท่ากับ 0.3 ml/min แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 220 nm ทำการหา peak areas ของน้ำตาลผลผลิตเทียบกับของน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น



## บทที่ 3

## ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

## 3.1. การแยกและวิเคราะห์ยีน

จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC BAA-1116 BB120 พบว่ามียีนที่ผลิตเอนไซม์โคโตไบเอสหรือเอ็น อะซิทิลกลูโคซามินิเดส ที่ประกอบด้วย 3 ORF ด้วยกันคือ VIBHAR\_03430 (Swiss-Prot: A7MY8) VIBHAR\_06345 (Swiss-Prot: A7N8P3) และ VIBHAR\_01265 (Swiss-Prot: A7N1G4) ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยใช้ ORF ทั้งสามเป็นต้นแบบเพื่อทำการสกัดแยกยีนจากเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่ศึกษาคือสายพันธุ์ 650 โดยวิธีการเพิ่มจำนวนยีนทาง PCR ผลการทดลองให้ชิ้น PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ใช้ VIBHAR\_03430 และ VIBHAR\_01265 เป็นต้นแบบ จึงให้ชื่อว่า VhNag1 และ VhNag2 ส่วนชิ้นที่ใช้ไพรเมอร์ของ VIBHAR\_06345 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้สำเร็จ เมื่อทำการโคลนยีน VhNag1 และ VhNag2) เข้าสู่ pQE60 expression vector ได้โคลนที่เรียกว่า pQE60/VhNag1 และโคลน pQE60/VhNag2 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน VhNag1 พบว่าประกอบด้วย 2,343 bp ที่สังเคราะห์สายโพลีเพปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนเป็น 778 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 3.1. มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณเป็น 88,849 Da และมีค่า pI เท่ากับ 4.9

## ➤ Translated VhNag1

```

MGQGKITLDK SFSIYIKGYD SPRVQFNAKR TMDRLYRQTG LPMLNWAHES EKDATLVIDI RNAPKSEVQD
IHSEKSYQLE SRNGQIIIRS ERPYGAFHGL ETFLQLVTTD VTGYFVPAVL IQDEPRFPWR GVSYDTSRHF
IELDVILRQL DAMASAKMNV FHWHIWDDQA IRIQLDNYQK LWQDTADGDY YTKDEIRHVV NYARNLGIHV
IPEISLPGHA SAVAHAYPEL MSGMGESYYP HQRVWGVFEP LMDPTNPELY KMLASVFDEV VELFPDEYFH
IGGDEPNYQQ WKDNPKIQQF IKDNNLDGER GLQSYLNTKV EQMLEQRDCK MTGWDEIWHK DLPTSIVIQS
WQGHDSIGRA AKEGYQGILS TGYLDQFPQ TSYHYRNDPM PKGITIDDQL HQGEKFATYD WVKPRNKGPP
RTGNLTIIIEA TDGSYRAFTD YNGKSREEVF IIEYVPGVKF KGHFDNFMSY TEFNYDFADG KLDKTSYQLI
GNVRWPATGE LVASSDMAGG VIPEPKGGYP AELTEKEQLL ILGGEITIWG ENLDSMTIEQ RLWPRSYAIA
ERLWSSQELT DERSMYKRMT VMDTWSEISL GLRHYADSNM MLKRLANGAD ETPLLTAKY IEPAQYYSRH
WEKWISTPNE GDLYNQYERL NRFADALPVE SLAVYEMKDL VAAYAQGDKA ALDALAMHYQ SVKLAAQQAQ
PIFAANVASV ETVPVADAAI KVADLGLTWI ELAKQGS DIS QSDAEAYQRI INENAIIFDE TIVAILVPTE
QLLHTLTD

```

รูปที่ 3.1. ลำดับกรดอะมิโนของ VhNag1 ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 650

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน VhNag2 พบว่าประกอบด้วย 1,926 bp ที่สังเคราะห์สายโพลีเพปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนเป็น 639 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 3.2. มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณเป็น 73,143 Da และมีค่า pI เท่ากับ 5.4

➤ **Translated VhNag2**

```
MEYRVDLVVL SEQKQNCRFQ LTFHNLSDQD LNSWSLTFQAF DRYILPDSVS NGHLTQVGSF CTLKPEGMAL
AANHYYCEF SIGSNPFRYY SDGFNEAMID FVVDGTPQRA QVDVTPIVLA SPYRERSEIP ASLTHAQPLL
PKPNHIEVSD QSFTTFDEQAG VAIYTDLATS AKSWLQDELK RIYQFELPSS NSGKILFKSN PTLDEGTYKL
KVSEESIKIE AGSSSGFTHA CATLLQLLKR DETTNTMDVV CCSIKDSPRF RYRGMMLDCA RHFYSVEQVK
RLINLLAHYK FNTFWHLTD DEGWRIEIKS LPQLTDIGAW RGIDDTIEPQ YTHLSQRYGG FYTQEEIKDV
IEFAAQRGIT IPEIDVPGH CRAAIKSLPH LLVEAEDTTE YRSIQHYNDN VINPALPGSY EFIDKVLLEI
AALFPAPYVH IGADVPNGV WSKSPACQAF MEQLGYTDYK ELQGHFLRHA EDKLRKLGKR MLGWEEAQHG
NKVSKDTVIY SWLSEEAALN CARQGFQVVL QPAQTTYLDM TQDYAPEEPG VDWANPLPLE KAYNYEPLAE
VPADDDPIRKR IWGIQTALWC EIINNPSRMD YMIFPRLTAM AEACWTEKQH RDWTDYLSRL KGHLPLLDLQ
GVNYRKPWK
```

รูปที่ 3.2. ลำดับกรดอะมิโนของ VhNag2 ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 650

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้ submit ลงในฐานข้อมูล GenBank/EMBL/DDBJ database มี accession number เป็น HM175715 สำหรับ VhNag1 และ HM175716 สำหรับ VhNag2 ผลการทำ BLAST search พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VhNag1 และ VhNag2 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hypothetical proteins ที่อาจมีคุณสมบัติเป็น GlcNAcase จากเชื้อ *Vibrio* species อื่น ๆ

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม SignalP ไม่พบว่ามีสาย putative signal peptide ของโพลีเปปไทด์ทั้ง VhNag1 และ VhNag2 ทำให้ได้ข้อสรุปว่าเอนไซม์ทั้งสองมีคุณสมบัติเป็น non-secretory protein หรือเอนไซม์ที่ทำงานภายในไซโตพลาสซึม

การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ VhNag1 และ VhNag2 พบเอนไซม์ทั้งสองจัดอยู่ในไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 20 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากที่สุดกับ  $\alpha$ -chain ของเอนไซม์ human GlcNAcase (HuHexA, 30% identity) [22] ตามด้วย *Serratia marcescens* chitobiase (*SmChb*, 24%) [23] รูปที่ 3.3. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ VhNag1 และ VhNag2 กับเอนไซม์ GlcNAcases 3 ชนิดคือ VhChb [12] ซึ่งเป็น GlcNAcase ที่รายงานจากเชื้อ *V. harveyi* เช่นเดียวกัน และ HuHexA กับ *SmChb*

เมื่อเทียบกรดอะมิโนที่สำคัญ ๆ ที่ conserve กับเอนไซม์ *SmChb* ที่มีการรายงานโครงสร้างสามมิติแล้ว พบ acidic pairs คือ Asp287-Glu288 (*VhNag1*) หรือ Asp437-Glu438 (*VhNag2*) (รูปที่ 3.3. แสดงดอกจันสีแดง) ซึ่งตรงกับคู่กรดอะมิโน Asp539-Glu540 ของ *SmChb* ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา

```

SmChb : MNAFKLSALARLTAATMFLGGMSSAMADQQLVDLSQ-LKLNVRMLNRAGENGVDCAALGADWASCNRVFLTSLNSDCAIDGK...HSPRQTLRVNDQFKIAHLTG...LTLKLEPTAKFSFFAGRAVEIPVVAE... : 139
VhChb : --MLKHSLLAASVITT-LAGCSSLQSSQVNVSLADNLDIQYEVLTNRHAGNEGLACQMGAEWASCNKV...TILVNGEAVDSKID...HSIRLILLDVNEQFKISRTVGLDLHKLEPTDKFDGFAAGEEVLPLVGE... : 137
VhNag2 : QLETDTFMPGAFVSAFNAEPKMIASLNTEDVASFVTGLEGNLKRTPDDNNVFANVSR...EKNEEDLATQDVSTT...LLPTMHVEAGKG...VADGIALPKFIATQFAAQDRAB...VDVRG-DLFPV...TTFVADF... : 273
HuHexA : -----MGSSEYRVLVVLSQKQNC-RFG...FAARAFATALM...PQM...TOS...-----EGVILAAHHH... : 80
VhNag1 : -----MTSSRLWFL...-----GSSG...K...I...L...K...S...Y...Y...I...G...Y... : 22

SmChb : QLETRNDFLFRWYATSGLAKPKMIANTDTENLDQVFVFT...QWKRKDKDKNILMTFASR...VSNADLQTLFAGALRGKIVPTFMQVHQAQ...L...LR...E...VALDLSLTKFAADV...S...R...F...G...P...V...Q...T...N...G...Y...I...K...T...D...I...Q...P...G...K...F... : 279
VhChb : QLETDTFMPGAFVSAFNAEPKMIASLNTEDVASFVTGLEGNLKRTPDDNNVFANVSR...EKNEEDLATQDVSTT...LLPTMHVEAGKG...VADGIALPKFIATQFAAQDRAB...VDVRG-DLFPV...TTFVADF... : 273
VhNag2 : CE...S...I...G...S...N...F...R...Y...Y...D...G...-----F...N...E...A...M...I...D...F...V...V...G...Q...P...Q...V...D...V...T...P...I...V...L...A...S...P...R...E...R...S...D...I...F...A...S...L...H...A...Q...P...L...L...P...K...P...N...H...I...E...V...S...D...H...S...F...T...E...Q...A...G...V...A...I...Y...T...D...L...A...N...S...A...K...A...M...I...E...E...L...Q...R...O...F...L...T...S...S...N...S...G...K...I...F...K...----- : 201
HuHexA : V...L...P...N...N...-----P...Q...F...Q...V...S...S...A...Q...P...G...C...V...L...D...E...A...F...Q...R...-----L...L...L...E...G...S...G...W...F...R...Y...L...T...G...R...H...T...E...K...N...V...L...V...S...V...T...P...G...C...N...Q...L...P...T...E...S...----- : 112
VhNag1 : -----S...P...R...V...Q...F...N...A...K...R...T...M...D...R...L...Y...Q...T...G...-----L...E...M...L...W...H...E...S...E...K...A...T...L...I...D...I...R...N...A...F...K...S...E...V...Q...L...I...H...S...----- : 76

SmChb : KGAMAVSAG...K...G...K...E...A...C...I...G...F...D...C...A...V...F...Y...G...V...L...L...P...S...D...G...S...G...K...-----A...T...L...A...S...I...A...L...P...E...I...P...E...M...K...K...I...A...V...I...R...I...C...A...Y...M...I...K...K...I...E...S...G...W...R...I...P...G...L...E...R...V...G...Q...R...C...H...L...S...E...T...T...C...L...L...P...Q...Y...G...G... : 416
VhChb : TGELAKSGA...E...S...K...G...D...G...I...R...A...F...D...C...A...A...F...Y...A...V...I...F...G...D...S...Q...N...A...D...S...-----L...P...L...S...K...A...A...R...I...D...I...V...A...N...S...K...S...K...L...A...T...I...C...Y...A...M...K...I...L...I...T...E...G...R...L...P...G...L...E...R...V...E...A...N...R...C...F...D...T...E...K...S...L...L...P...Q...L...G...S...G... : 410
VhNag2 : SNPTLDEGAK...K...S...E...E...S...I...K...E...A...G...S...S...F...T...H...A...C...A...L...L...C...K...R...D...E...A...T...K...M...E...A...V...C...C...S...I...S...R...N...F...V...M...I...C...A...E...S...H...S...V...E...Q...K...R...L...L...D...I...L...H...Y...H...G...R...V...K...S...L...Q...E...I...C...A...W...R...G...I...D...E...T...-----I...E...P...Q...Y...T...H...L... : 337
HuHexA : T-----V...E...N...T...I...N...D...Q...L...L...S...E...T...V...M...A...L...R...G...I...F...S...C...K...W...K...S...A...E...G...T...F...F...I...N...K...T...E...R...P...P...P...P...I...T...S...E...L...P...L...S...I...D...T...I...D...V...N...V...N...V...E...H...V...V...P...S...P...Y...S...T...T...F...E...M...R...K...S...-----Y...N...P...V... : 230
VhNag1 : -----D...E...S...I...Q...B...S...R...N...Q...I...T...R...S...E...R...P...Y...A...F...H...G...E...I...F...L...C...I...T...L...T...A...T...G...Y...-----F...I...F...A...V...S...C...E...I...R...E...P...S...Y...S...I...T...S...E...I...E...L...D...V...R...C...A...V...S...A...V...V...E...H...I...M...G...A...I...R...I...D...N...Y...Q...S...M...I...D...T...A...D...G...----- : 191

SmChb : P--D...V...Y...G...-G...E...R...Q...D...Y...I...L...L...K...C...A...Q...L...E...R...E...I...D...P...A...R...A...V...V...S...E...A...R...Y...K...K...L...H...A...A...G...K...E...Q...E...A...N...E...F...F...O...P...T...D...S...N...T...T...V...Q...F...N...R...Q...S...K...D...S...Q...R...H...D...K...I...G...A...C...H...K...E...A...G...Q...I...K...T...A...S...A...K...N...I...R...L...G...A...G...Y...T...D...K... : 553
VhChb : P...T...T...I...N...F...G...S...G...K...A...D...Y...V...E...R...A...R...A...N...E...E...E...I...D...P...A...R...A...V...V...S...E...A...R...Y...D...R...L...M...E...E...G...K...E...A...E...N...E...F...F...O...P...D...S...N...V...T...V...Q...Y...N...K...Q...S...P...K...S...E...S...T...E...R...D...K...I...S...A...M...H...Q...E...A...G...A...P...L...T...T...B...E...K...N...I...K...L...G...A...G...F...Q...D...V... : 550
HuNag2 : S--Q...R...Y...G...-G...E...R...Q...E...I...R...I...D...P...A...R...A...V...V...S...E...A...R...Y...D...R...L...M...E...E...G...K...E...A...E...N...E...F...F...O...P...D...H...E...A...D...E...G...S...E...R...I...O...B...Y...N...-D...N...V...A...P...G...S...Y...E...R...D...K...L...E...S...I...A...A...F...E...A...P...-----Y...V...I...L...F...A...V...D... : 440
HuHexA : T-----H...I...A...Q...D...V...K...E...R...I...G...R...V...A...F...I...T...G...T...L...S...W...G...P...G...P...-----S...N...N...Y...E...R...S...T...F...L...G...S...F...E...D...F...-----Y...I...L...G...I...G...S...V...D... : 325
VhNag1 : -----I...V...K...E...I...R...Y...M...A...R...N...L...G...R...E...S...I...C...A...S...V...A...H...A...Y...P...-----E...L...S...G...M...G...E...S...Y...P...H...O...R...G...V...F...E...P...I...M...T...N...E...F...E...L...Y...M...A...S...F...E...L...V...E...F...D...E...-----Y...E...I...G...S...P...N... : 290

SmChb : AKPEPG--KGII...D...Q...S...N...E...D...K...A...K...S...V...C...I...K...E...K...V...-A...M...E...H...E...S...V...G...E...S...S...K...V...A...H...I...D...R...M...C...D...G...L...K...A...E...S...K...A...F...A...T...S...R...V...G...N...F...W...D...T...L...G...G...F...S...N...E...W...A...N...K...D...I...D...S...N...P...P...Y...V...D...F...E...V...E...N...P... : 678
VhChb : NAEKRVSMKGTIDLSKQDKFAGEGQCITLTDGTV-SFAFH...E...H...A...E...L...S...K...A...E...K...I...P...N...C...M...D...G...L...K...Y...S...D...G...E...A...F...A...T...E...N...F...W...D...V...I...L...G...G...T...S...S...Y...E...W...K...K...D...I...D...S...N...P...P...Y...V...N...E...V...E...D...P... : 677
VhNag2 : -----N...G...V...K...S...A...C...A...I...E...Q...L...G...Y...-T...Y...K...E...G...H...L...R...H...A...E...D...K...K...R...-M...L...G...E...A...G...H...N...K...V...K...O...T...I...Y...-----S...L...S...E...A...A...L...C...A...R...G...D...I...L...P...A...Q...T...T...I...M...T...O...D...Y...A...P... : 539
HuHexA : -----F...T...Q...K...S...N...E...I...D...H...R...K...K...G...P...G...D...F...K...C...E...P...I...Q...I...T...L...L...I...S...S...Y...K...-Y...V...G...E...V...F...D...N...K...V...I...Q...P...D...T...I...I...Q...-----V...R...E...D...I...P...N...-Y...M...K...E...L...P...T...K...A...G...F...R...I...S...A...W...Y...L...N...R... : 424
VhNag1 : -----Y...Q...K...D...N...K...I...Q...F...K...D...N...N...L...-D...G...E...R...C...O...S...Y...L...N...T...R...V...E...Q...E...R...K...-M...T...G...-D...E...I...W...H...D...L...P...T...S...I...V...I...Q...S...-----L...Q...H...D...S...G...R...A...K...E...S...I...Q...I...S...T...G...Y...L...D...Q...P...E...T...S...Y...H...R...N...D...F...M...P...K...I...T...V...D... : 400

SmChb : -----D...E...G...Y...T...G...R...F...S...D...E...R...K...V...F...S...A...P...D...N...M...Q...N...A...T...S...V...D...R...D...G...N...H...F...N...A...K...-----S...D...K...F...P...G...A...Y...L...S...A...Q... : 735
VhChb : -----R...E...S...T...H...A...T...R...A...T...R...K...M...F...G...A...F...E...N...M...Q...N...A...T...S...V...D...R...D...G...N...G...T...G...K...-----G...E...I...E...A...K...P...F...I...L...S...A...Q... : 734
VhNag2 : -----E...S...T...P...M...A...N...-----L...P...L...R...A...Y...Y...E...I...A...E...V...A...-----D...D...I...F...R...K...I...Q...T...A... : 580
HuHexA : -----I...S...P...R...K...D...-----F...Y...V...E...I...A...F...E...G...T...-----P...E...Q...K...A...L...M...G...E...A...C... : 458
VhNag1 : D...Q...L...H...Q...E...K...F...A...T...Y...D...W...V...K...F...R...N...K...G...G...R...T...G...N...L...T...I...E...A...D...T...D...G...S...Y...R...A...F...T...D...Y...N...G...K...S...R...E...E...V...I...I...E...Y...P...G...V...K...F...K...G...H...D...N...M...S...Y...I...E...N...Y...D...A...G...K...L...D...S...Y...Q...L...I...G...N...V...R...K...A...T...C...L...V...A...S...S...M...E...G...S...I...P...E...P...G...Y...F...A...E...L...T...E...K...E...Q...P...L...I...L...G...E...I...T... : 540

SmChb : ...S...T...O...R...T...D...E...C...E...Y...M...I...A...L...S...A...R...S...H...R...A...G...W...E...Q...D...-----Y...F...A...G...R...E...Y...K...G...G...E...T...H...F...V...D...I...C...A...L...E...K...L...R...F...A...M...I...G...Q...R...E...L...A...K...D...K...G...G...A...R...V...I...P...V...P...G...A...R...V...A... : 828
VhChb : ...S...T...O...R...N...D...E...Q...E...Y...E...M...I...A...R...A...H...R...A...D...W...E...N...D...-----Y...K...V...G...E...Y...S...Q...-N...S...N...L...V...D...R...A...S...L...N...G...Y...N...R...F...A...N...V...G...Q...R...E...L...A...K...E...K...S...I...D...R...I...P...V...P...G...A...R...K...V...E...D... : 826
VhNag2 : ...C...T...I...N...N...F...R...D...Y...M...I...P...L...I...N...H...A...C...T...-----E...K...Q...H...R...W...I...D...Y...L...S...R...K...G...-H...L...P...I...D...L...Q...V...N...R...K...P...K...-----S... : 642
HuHexA : ...G...E...S...Y...I...D...N...-I...N...V...F...K...P...A...G...A...V...R...E...L...S...-----N...K...L...T...S...L...T...F...A...Y...E...R...S...H...E...F...C...E...L...I...R...R...G...V...C...A...Q...I...N...V...G...F...C...E...Q...E...F... : 526
VhNag1 : ...G...E...S...Y...I...D...S...-M...T...E...Q...P...H...S...V...A...V...A...I...L...S...S...Q...L...T...D...E...R...S...M...Y...K...M...K...V...M...D...T...W...E...I...S...L...G...L...R...H...H...A...D...A...I...M...L...K...R...I...A...N...G...A...D...E...T...P...L...Q...T...L...A...K...Y...I...E...F...A...Q...Y...A...R...H...W...E...K...W...I...S...T...F...N...E...G...L...Y...N...Q...E...N...R...F...A...L...F...E...S...I...A...V...E...Q...L...D...V...A...Y...A...L... : 679

SmChb : GKLEANIALPGLGIEYSTDGGKQWRYLAKAKFAVSGEVQVRSVSPDGKRYSPAEKV----- : 885
VhChb : GKLANVQFPGVTLQYSLDG-ENWLTYADNARPNVTGEVIRSVSATGEKVSRTSVK----- : 883
VhNag2 : ----- : -
HuHexA : EQT----- : 529
VhNag1 : GDKTALALAMHYQSVKLAQAQAKPIFAANVASVETVPVAEAAIKVADLGLTLIELAKQGSDISQCAEAYRQRTINENAIIFDFTIVAVVWPEQLLHTLITO----- : 781

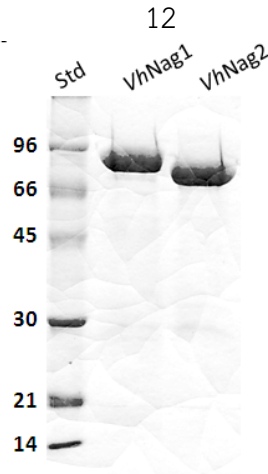
```

รูปที่ 3.3. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ VhNag1 และ VhNag2 กับเอนไซม์ GlcNAcases แฟมิลี GH-20

ส่วนกรดอะมิโนอื่น ๆ ที่สำคัญต่อการจับกับสับสเตรทได้แก่ Asp346, Arg349, Asp378, Asp379, Trp616, Trp685 และ Trp737 (รูปที่ 3.3. แสดงจุดสีน้ำเงิน) กรดอะมิโนเหล่านี้มีลักษณะ completely conserve ในเอนไซม์กลุ่ม GlcNAcases แฟมิลี GH-20

### 3.2. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการตรวจด้วยวิธีทางแมสสเปกโตรเมทรี

เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของ full-length VhNag1 และ full-length VhNag2 ในยีนที่โคลนเข้าสู่ pQE60 expression vector พบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ M15 สามารถผลิตโปรตีนออกมาในรูปที่มี (His)<sub>6</sub> ติดอยู่ที่ปลายด้านคาร์บอกซี หลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยวิธี Ni-NTA agarose affinity chromatography ตรวจหาปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 5 - 10 mg/ml ของเอนไซม์บริสุทธิ์ต่อปริมาตรของแบคทีเรียที่เลี้ยง 1 ลิตร รูปที่ 3.4. แสดงผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ VhNag1 และ VhNag2 ด้วย SDS-PAGE จากเจลพบการเคลื่อนที่ของ VhNag1 ต่ำกว่า 96 kDa และของ VhNag2 อยู่สูงกว่า 66 kDa เล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่รู้น้ำหนักโมเลกุลแล้ว



รูปที่ 3.4. SDS-PAGE ของเอนไซม์บริสุทธิ์ VhNag1 และ VhNag2

การทดลองต่อมาคือการตรวจสอบว่าเอนไซม์ทั้งสองเป็น GlcNAcases โดยการเตรียม tryptic peptides แล้วแยกวิเคราะห์มวลของเปปไทด์ด้วยวิธี HPLC-MS การทำ peptide mass fingerprint ตรวจสอบพบว่าเปปไทด์ 9 ชิ้น และเปปไทด์ 13 ชิ้น ของ VhNag1 ที่เหมือนกับเปปไทด์ของ GlcNAcase ของเชื้อ *V. angustum* และ *Photobacterium sp.* ตามลำดับ ส่วนเปปไทด์ 20 and 21 ชิ้นของ VhNag2 เหมือนกับเปปไทด์ของ GlcNAcases ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ดังแสดงในตารางที่ 3.1. ผลการวิเคราะห์มวลของเปปไทด์ที่ได้ให้ข้อสรุปว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ VhNag1 และ VhNag2 ที่แสดงออกใน *E. coli* เป็นเอนไซม์เอ็น อะซิทิลกลูโคซามินิเดส

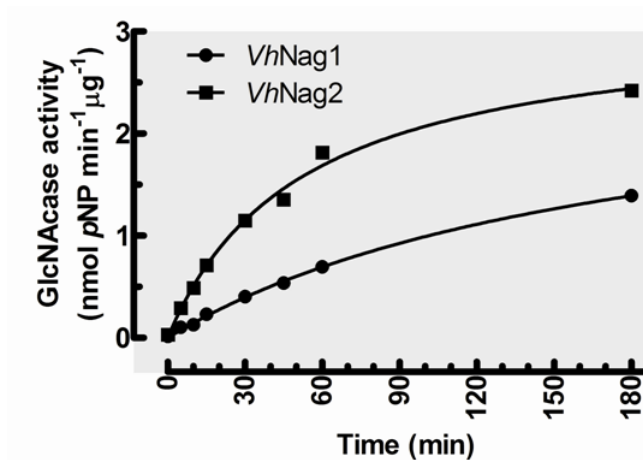
ตารางที่ 3.1. แสดงมวลของเปปไทด์ VhNag1 และ VhNag2 ที่วิเคราะห์ด้วยการทำ mass fingerprinting

Observed monoisotopic mass (MH <sup>+</sup> )	Charge (Z)	Peptide sequence	Protein ID	Identified protein จากฐานข้อมูล UniProtKB/TrEMBL
<b>VhNag1</b>				
442.7084	2	R.GVSYDTSR.H	gi	N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase
1055.0401	2	K.DLPTSIVIQSWQGHDSIGR.A	84386131	[ <i>Vibrio splendidus</i> 12B01]
429.2415	2	K.SFSIYIK.G	gi	N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase
442.7084	2	R.GVSYDTSR.H	90578682	[ <i>Vibrio angustum</i> S14]
458.2134	2	R.AFTDYNGK.S		
512.2765	2	R.GLQSYLNTK.V		
579.7795	2	R.AFTDYNGKSR.E		
627.8628	2	R.HFIELDVILR.Q		
434.8691	3	K.MTGWDEIWHK.D		
841.9339	2	K.SIVIQSWQGHDSIGR.A		
946.1122	3	K.EGYQGILSTGYLDQPPTSYPHYR.N		
353.6976	2	R.VQFNAK.R	gi	N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase [ <i>Photobacterium</i>
388.7367	2	K.IQQFIK.D	89074271	<i>sp.</i> SKA34]
388.7367	2	R.SYAVAER.L		
429.2415	2	K.SFSIYIK.G		
431.7478	2	R.VQFNAKR.T		
442.7084	2	R.GVSYDTSR.H		
458.2134	2	R.AFTDYNGK.S		
512.2765	2	R.GLQSYLNTK.V		

383.8657	3	R.HHADANIMLK.R		
579.7795	2	R.AFTDYNGKSR.E		
627.8628	2	R.HFIELDVILR.Q		
434.8691	3	K.MTGWDEIWHK.D		
841.9339	2	K.SIVIQSWQGHDSIGR.A		
<b>VhNag2</b>				
434.7350	2	R.HAEDKLR.K	gil	$\beta$ -N-hexosaminidase [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]
477.2030	2	R.GMMLDCAR.H	799237	
500.2713	2	K.ELQGHFLR.H		
528.2427	2	R.DWTDYLSR.L		
555.7875	2	R.HFHSVEQVK.R		
565.3261	2	R.VDLVVLSEQK.Q		
582.7828	2	K.GNPTLDEGAYK.L		
422.8950	3	R.HFHSVEQVKR.L		
432.8909	3	R.DWTDYLSRLK.G		
492.9035	3	K.QHRDWDYLSR.L		
797.9385	2	K.GHLPLLDLQGVNYR.N		
814.9538	2	R.AQVDVTPIVLASPYR.E		
563.2973	3	R.VDLVVLSEQKQNCR.F		
612.6872	3	R.LKGHLPLLDLQGVNYR.N		
638.6863	3	R.AQVDVTPIVLASPYRER.S		
966.9709	2	K.AYNYEPLAEVPADDDPIR.K		
1031.0179	2	K.AYNYEPLAEVPADDDPIRK.R		
1049.4992	2	K.DTVIYSWLSEEAALNCAR.Q		
1102.5731	2	K.IEAGSSSGFTHACATLLQLIK.V		
804.7335	3	K.VSKDTVIYSWLSEEAALNCAR.Q		
1317.6454	2	R.SIQHYNDNVINPALPGSYEFIDK.V		
477.2030	2	R.GMMLDCAR.H	gil	$\beta$ -N-hexosaminidase [ <i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01]
528.2427	2	R.DWTDYLSR.L	91228309	
536.7506	2	R.MDYMIFPR.L		
565.3261	2	R.VDLVVLSEQK.Q		
582.7828	2	K.GNPTLDEGAYK.L		
432.8909	3	R.DWTDYLSRLK.G		
492.9035	3	K.QHRDWDYLSR.L		
797.9385	2	K.GHLPLLDLQGVNYR.K		
540.6236	3	R.GITIPEIDVPGHCR.A		
814.9538	2	R.AQVDVTPIVLASPYR.E		
838.9433	2	R.GITIPEIDVPGHCR.A		
563.2973	3	R.VDLVVLSEQKQNCR.F		
612.6872	3	R.LKGHLPLLDLQGVNYR.K		
638.6863	3	R.AQVDVTPIVLASPYRER.S		
966.9709	2	K.AYNYEPLAEVPADDDPIR.K		
1031.0179	2	K.AYNYEPLAEVPADDDPIRK.R		
1049.4992	2	K.DTVIYSWLSEEAALNCAR.Q		
1102.5731	2	K.IEAGSSSGFTHACATLLQLIK.V		
804.7335	3	K.VSKDTVIYSWLSEEAALNCAR.Q		
1317.6454	2	R.SIQHYNDNVINPALPGSYEFIDK.V		
477.2030	2	R.GMMLDCAR.H	gil	N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase [ <i>Vibrio splendidus</i> 12B01]
685.8747	2	K.SLPQLTEIGAWR.G	84393823	
704.6731	3	K.ETIYSWLSEEAAVNCAR.Q		

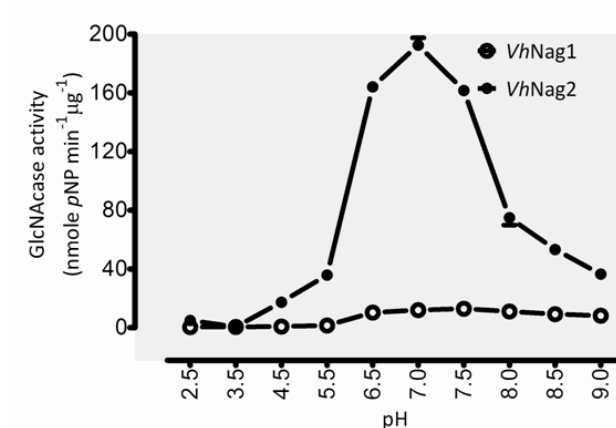
### 3.3. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

เมื่อทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยใช้ *pNP-GlcNAc* เป็นสับสเตรทพบว่า *VhNag2* มีแอกติวิตี้ของการย่อยสับสเตรทดังกล่าวสูงกว่าเอนไซม์ *VhNag1* ซึ่งเหตุผลอาจเป็นเพราะเอนไซม์ *VhNag1* อาจถูกผลิตออกมาในรูป *pro-enzyme* ที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการ *proteolytic processing* เพื่อให้ได้รูปเอนไซม์ที่ทำงานได้สมบูรณ์ รูปที่ 3.5. แสดงปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท *pNP-GlcNAc* ของ *VhNag1* และ *VhNag2* ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าแอกติวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองมีช่วง *linear* อยู่ภายในเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแอกติวิตี้เริ่มช้าลงที่เวลาผ่านไป ในการวัดค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาทั้งสองผู้วิจัยได้เลือกเวลาในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 10 นาที เพื่อทำการศึกษาคณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์



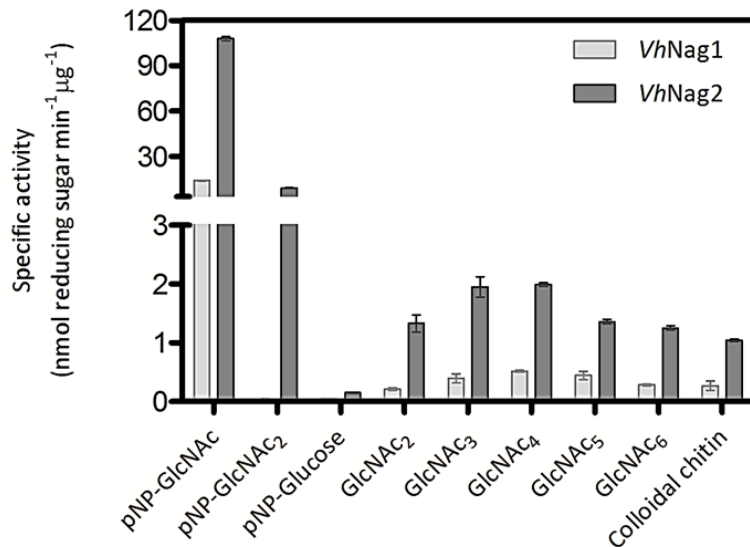
รูปที่ 3.5. แสดง reaction progress curve ของเอนไซม์ *VhNag1* และ *VhNag2*

ต่อมาทำการศึกษาผลของ pH ต่อแอกติวิตี้ของการสลาย *pNP-GlcNAc* ของเอนไซม์ *VhNag1* และ *VhNag2* รูปที่ 3.6. แสดง pH curve ของเอนไซม์ทั้งสองมีลักษณะเป็นรูปประฆังคว่ำคล้ายกับ pH curve ของเอนไซม์ไกลโคซิเดสอื่น ๆ โดยที่แอกติวิตี้ของเอนไซม์ *VhNag1* จะต่ำกว่าของ *VhNag2* ในทุกค่า pH ที่ทดสอบ จากรูป สามารถประมาณค่า optimum pH ของ *VhNag1* อยู่ที่ช่วงกว้าง ประมาณ pH 6.5-7.5 ส่วนของ *VhNag2* อยู่ที่ pH 7.0



รูปที่ 3.6. ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ *VhNag1* และ *VhNag2*

เมื่อทำการวัดหาค่า specific hydrolytic activity ของเอนไซม์ทั้งสองเปรียบกันกับสับสเตรทหลาย ๆ ชนิด พบว่าค่า specific activity ต่อสับสเตรท pNP-GlcNAc มีค่าสูงที่สุดดังแสดงในรูปที่ 3.7.



รูปที่ 3.7. การตรวจหาค่า specific activity ต่อสับสเตรทชนิดต่าง ๆ

จากรูปที่ 3.7. จะเห็นว่าเอนไซม์ VhNag2 สามารถสลายสับสเตรท pNP-glycosides ได้ทุกตัว แต่ให้ค่าการแอคติวิตี้ต่อ pNP-GlcNAc<sub>2</sub> และ pNP-Glucose ต่ำกว่า pNP-GlcNAc อยู่ประมาณ 300 เท่า และ 700 เท่าตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ VhNag1 ย่อยสลายสับสเตรทกลุ่ม pNP-glycoside ได้ตัวเดียวคือ pNP-GlcNAc แต่แอคติวิตี้ต่ำกว่าของ VhNag2 อยู่ประมาณ 4 เท่า เมื่อใช้โคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และโคตินเป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ทั้งสองย่อยสับสเตรททั้งหมดได้ แต่ให้ค่าแอคติวิตี้ต่อ chitotetraose สูงที่สุดตามด้วย chitotriose และเอนไซม์ย่อย chitobiose chitopentaose และ chitohexaose ได้ปานกลาง ส่วนแอคติวิตี้ต่อโคตินมีค่าต่ำที่สุด

เนื่องจากเอนไซม์ VhNag1 ไม่เสถียรและสูญเสียแอคติวิตี้อย่างรวดเร็วหลังการทำบริสุทธิ์ ผู้วิจัยจึงเลือกทำการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ VhNag2 เพียงตัวเดียว ค่าทางจลนพลศาสตร์ที่ได้แสดงในตารางที่ 3.2. พบว่า VhNag2 ในค่า  $K_m$  ต่ำที่สุดและค่า  $k_{cat}$  สูงสุดกับสับสเตรท pNP-GlcNAc โดยค่าคำนวณ  $k_{cat}/K_m$  มีค่าเท่ากับ  $4,935 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  เมื่อเทียบกับสับสเตรทกลุ่มโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ด้วยกันพบว่า VhNag2 แสดงค่า  $k_{cat}/K_m$  สูงสุดต่อ chitotetraose เท่ากับ  $304 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ตามด้วยค่าของ GlcNAc<sub>3</sub> เท่ากับ  $228 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ส่วนสับสเตรท GlcNAc<sub>5</sub> ให้ค่า  $181 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  สับสเตรท GlcNAc<sub>6</sub> ให้ค่า  $166 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  และ GlcNAc<sub>2</sub> ให้ค่า  $56 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  และค่า  $k_{cat}/K_m$  ของ VhNag2 สับสเตรท pNP-GlcNAc สูงกว่าของ GlcNAc<sub>2</sub> เป็น 88 เท่า ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าพันธะไกลโคซิดิกของ pNP-GlcNAc ถูกสลายโดยเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพันธะไกลโคซิดิกของ GlcNAc-GlcNAc เนื่องจากในพันธะของ pNP-GlcNAc มี electron-withdrawing capacity ของหน่วย pNP สูงกว่าทำให้พันธะแตกง่ายกว่า ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลอง

ของ Keyhani & Roseman [24] ที่แสดงให้เห็นว่า *Vibrio furnssii*  $\beta$ -GlcNAcidase (exol) สลาย pNP-GlcNAc ได้ดีกว่า GlcNAc<sub>2</sub> ถึง 5 เท่า

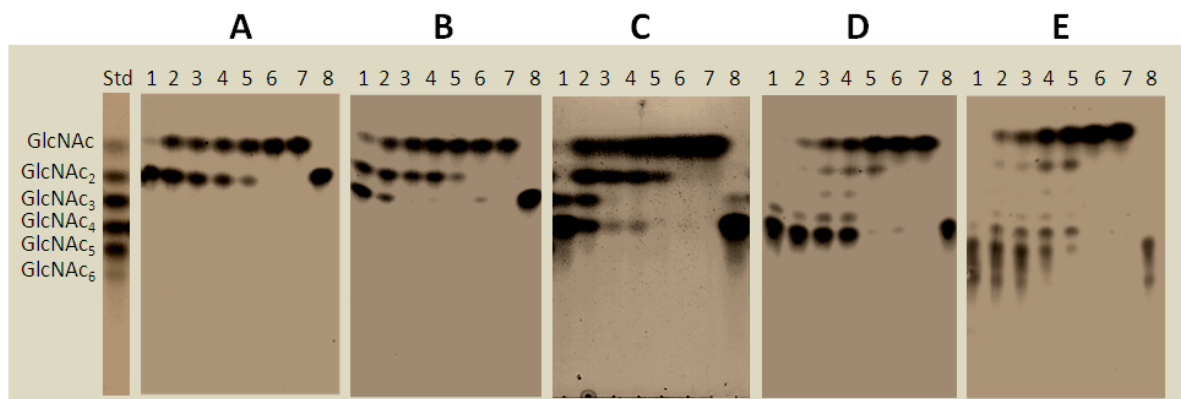
ตารางที่ 3.2. แสดงค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ *VhNag2*

Substrate	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
pNP-GlcNAc ( <i>VhNag1</i> )	$172 \pm 48^a$	0.08	465
pNP-GlcNAc( <i>VhNag2</i> )	$77 \pm 17$	0.38	4,935
GlcNAc <sub>2</sub>	$179 \pm 52$	0.01	56
GlcNAc <sub>3</sub>	$441 \pm 98$	0.10	228
GlcNAc <sub>4</sub>	$329 \pm 93$	0.10	304
GlcNAc <sub>5</sub>	$496 \pm 78$	0.09	181
GlcNAc <sub>6</sub>	$421 \pm 76$	0.07	166

<sup>a</sup> ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่า means  $\pm$  SD (n =3 experiments for each substrate)

3.4. การศึกษาผลผลิตของการย่อยไคตินด้วยเทคนิค TLC และ HPLC

เมื่อทำการศึกษารูปแบบการสลายน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ *VhNag2* โดยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 3.8. พบว่าผลิตภัณฑ์หลักของการสลายน้ำตาลที่ทดสอบทั้งหมดคือ GlcNAc โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GlcNAc<sub>3</sub> และ GlcNAc<sub>4</sub> จะถูกสลายหมดภายในเวลา 10 นาที (รูป 3.8B และ 3.8C) ขณะที่น้ำตาล GlcNAc<sub>5</sub> ถูกสลายได้ในเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 3.8D) เอนไซม์ *VhNag2* สามารถสลาย GlcNAc<sub>2</sub> (รูปที่ 3.8A) และ GlcNAc<sub>6</sub> (รูปที่ 3.8E) แต่ด้วยอัตราเร็วที่ต่ำกว่าคือภายในเวลา 2 ชั่วโมง

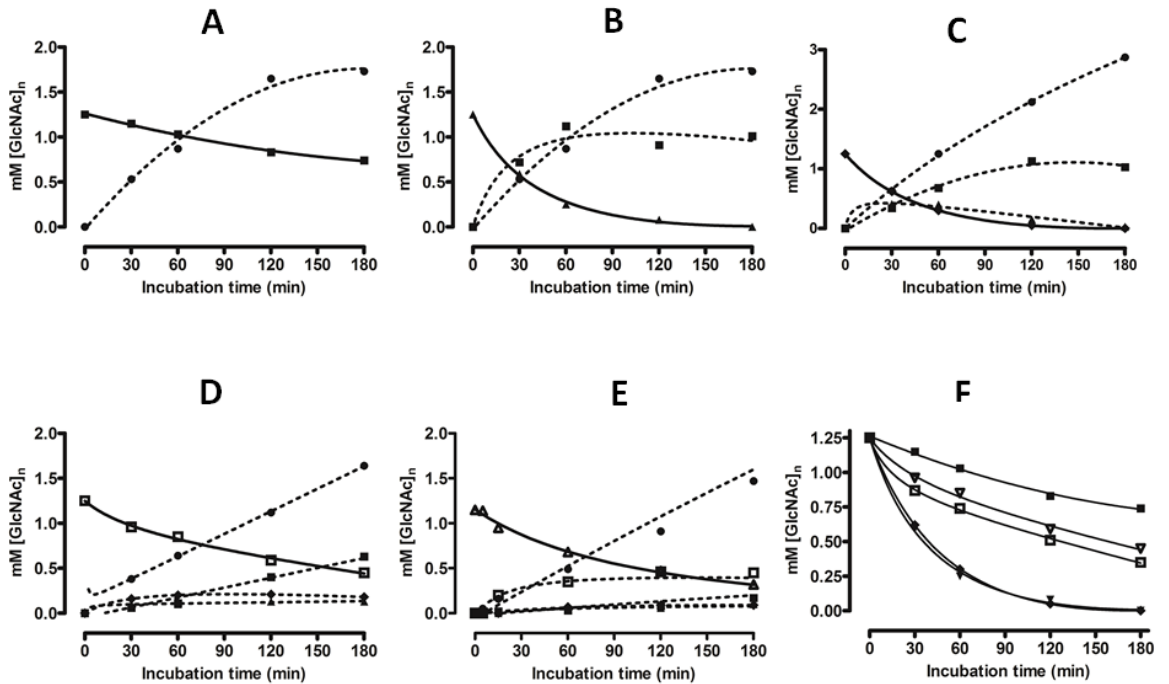


รูปที่ 3.8. การตรวจหาชนิดของการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์ *VhNag2* ด้วยเทคนิค TLC

A) chitobiose; B) chitotriose; C) chitotetraose; D) chitopentaose; E) chitohexaose



การตรวจหาผลผลิตของการสลายไคตินโอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์ *VhNag2* ด้วยวิธี quantitative HPLC ดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบว่าเอนไซม์สามารถย่อย  $\text{GlcNAc}_2$  ให้ผลิตผลเป็น  $\text{GlcNAc}$  อย่างรวดเร็วในเวลาของการทำปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.9A) ส่วนรูปที่ 3.9B และ C แสดงการย่อยสับสเตรท  $\text{GlcNAc}_3$  และ  $\text{GlcNAc}_4$  ซึ่งเกิดขึ้นรวดเร็วกว่าการสลาย  $\text{GlcNAc}_2$  และส่วนการสลาย  $\text{GlcNAc}_5$  และ  $\text{GlcNAc}_6$  จะช้ากว่าการสลาย  $\text{GlcNAc}_4$  มาก (รูปที่ 3.9D และ E)



รูปที่ 3.9. การตรวจหาชนิดของการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์ *VhNag2* ด้วยเทคนิค HPLC

A) chitobiose; B) chitotriose; C) chitotetraose; D) chitopentaose; E) chitohexaose; F) กราฟแสดงอัตราการลดลงของสับสเตรท

ผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีความสอดคล้องกับผลของ TLC ที่แสดงในรูปที่ 3.8 และผลิตผลหลัก  $\text{GlcNAc}$  ที่ได้เกิดจากปฏิกิริยาการสลายแบบ exolysis คือสับสเตรท  $\text{GlcNAc}_n$  ถูกย่อยเป็น  $\text{GlcNAc}_{n-1} + \text{GlcNAc}$  และได้น้ำตาล intermediate คือ  $\text{GlcNAc}_{n-1}$  และ  $\text{GlcNAc}_{n-2}$ , ซึ่งถ้าให้เวลาในการทำปฏิกิริยานานพอสาร intermediate ก็จะถูกย่อยเป็น  $\text{GlcNAc}$  ส่วนรูปที่ 3.9F แสดงกราฟอัตราการสลายตามลำดับดังนี้  $\text{GlcNAc}_4 \cong \text{GlcNAc}_3 > \text{GlcNAc}_5 > \text{GlcNAc}_6 > \text{GlcNAc}_2$

## บทที่ 4

### บทสรุป

#### 4.1. สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ผู้วิจัยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล genome database ของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ BAA-1116 BB120 ช่วยในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำการแยก ของยีนที่สร้างเอนไซม์เอ็น อะซิทิกลูโคซามินิเดสสองชนิดคือ VhNag1 และ VhNag2 จากแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 650 ได้สำเร็จต่อมาได้ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนทั้งสอง โดยเทคนิค PCR และทำการโคลนยีนเข้าสู่ pQE60 expression vector เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในระบบ *E. coli* สายพันธุ์ M15 (pREP) การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าเอนไซม์ VhNag1 และ VhNag2 ถูกสร้างในไซโตพลาสซึม โดยที่สายโพลีเพปไทด์ของเอนไซม์ VhNag1 มีจำนวนกรดอะมิโนเป็น 778 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณเป็น 88,849 Da และมีค่า pI เท่ากับ 4.9 ส่วนเอนไซม์ VhNag1 มีจำนวนกรดอะมิโนเป็น 639 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณเป็น 73,143 Da และมีค่า pI เท่ากับ 5.4 การทดสอบความสามารถในการสลายไคตินพบว่า VhNag1 มีความไวในการสลายสับสเตรททุกตัวเมื่อเทียบกับ VhNag2 ค่า optimum pH ของ VhNag1 มีค่าเท่ากับ 6.5-7.5 ส่วนของ VhNag2 มีค่าเท่ากับ 7.0 เอนไซม์ทั้งสองจัดเป็น exolytic enzyme ที่สลายไคตินให้ผลผลิตสุดท้ายคือ GlcNAc การศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่าสับสเตรทที่ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดคือ pNP-GlcNAc ขณะนี้ผล TLC และ ผล HPLC แสดงให้เห็นว่า chitotetrase เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในกลุ่มไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

#### 4.1. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี



### เอกสารอ้างอิง

1. Gooday GW. In Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1994, 279-312.
2. Davis B & Eveleigh DE. In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 1984, 160-179.
3. Tanaka T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. Characterization of an exo-beta-D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol.* 2003, 185:5175-5181.
4. Conzelmann E & Sandhoff K. Glycolipid and glycoprotein degradation. *Adv. Enzymol.* 1987, 60:89-216.
5. Drouillard S, Armand S, Davies GJ, Vorgias CE, Henrissat B. *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. *Biochem J.* 1997, 328:945-949.
6. Henrissat B & Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 1993, 293:781-788.
7. Henrissat B & Daviest G. Structural and sequence-based classification of glycoside Hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 1997, 7:637-644.
8. Stirling JL. Human N-acetyl-beta-hexosaminidases: hydrolysis of N, N' diacetylchitobiose by a low molecular weight enzyme. *FEBS Lett.* 1974, 39:171-175.
9. Stirling JL. NN'-diacetylchitobiase activity in Tay-Sachs disease and Sandhoff's disease. *Biochem J.* 1974, 141:597-599.
10. Tews I, Vincentelli R & Vorgias CE. N-Acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*: gene, sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene.* 1996,170:63-67.
11. Tsujibo H, Fujimoto K, Tanno H, Miyamoto K, Imada C, Okami Y & Inomori Y. Gene sequence, purification and characterization of N-acetyl-D-glucosaminidase from the marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain 0-7. *Gene.* 1994, 146:111-115.
12. Soto-Gil RW & Zyskind JW. N,N'-diacetylchitobiase: primary structure, processing, and evolution relationships. *J Biol Chem.* 1989, 264:14778-14783.
13. Aronson NN, Halloran BA. Optimum substrate size and specific anomer requirements for the reducing-end glycoside hydrolase di-N-acetylchitobiase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006, 70:1537-1541.

14. Suginta W, Robertson PA, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA. Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of *chiA* from *Vibrio carchariae*. *J Appl Microbiol*. 2000, 89:76-84.
15. Suginta W. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb. Tech*. 2007, 41:212-220.
16. Suginta W, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch Biochem Biophys*. 2004, 424:171-180.
17. Suginta W, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J*. 2005, 272:3376-3386.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227:680-685.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
20. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959, 31:426-428
21. McIlvaine TC. A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 1921, 49: 183-186
22. Lemieux MJ, Mark BL, Cherney MM, Withers SG, Mahuran DJ, James MN: Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *J Mol Biol* 2006, 359:913-929
23. Tews I, Perrakis A, Oppenheim A, Dauter Z, Wilson KS, Vorgias CE: Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat Struct Biol* 1996, 3:638-648
24. Keyhani NO, Roseman S: The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic beta-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* 1996, 271:33425-33432

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

### 1.1. LB Medium (Luria-Bacterial Medium)

Per litre:

To 950 ml of deionised H<sub>2</sub>O add:

bacto-tryptone      10 g

bacto-yeast extract   5 g

NaCl                      10 g

Shake until the solutes have dissolved. Adjust the pH to 7.0 with 5 N NaOH (0.2 ml). Adjust the volume of the solution to 1 litre with deionised H<sub>2</sub>O. Sterilise by autoclaving for 20 min at 15lb/sq. in. on liquid cycle.

### 1.2. SDS-PAGE

- Solutions for preparing 12% resolving SDS-polyacrylamide gel

Solution component	Component volume (ml)		
	5 ml	10 ml	20 ml
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	6.6
30% (w/v) acrylamide mix	2.0	4.0	8.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5.0
10% SDS	0.05	0.1	0.2
10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.05	0.1	0.2
TEMED	2 µl	4 µl	6 µl

- Solutions for preparing 5% stacking SDS-polyacrylamide gel

Solution component	Component volume (ml)	
	2 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	1.4	3.4
30% (w/v) acrylamide mix	0.33	0.83
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	0.63
10% SDS	0.02	0.05

10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.02	0.05
TEMED	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l

- Buffers for SDS-PAGE

SDS-gel loading buffer (3 x stock)

150 mM Tris.Cl (pH6.8)

300 mM dithiothreitol

6% SDS (electrophoresis grade)

0.3 % bromophenol blue

30% glycerol

- Tris-Glycine electrophoresis buffer (5 x stock)

250 mM Tris.Cl (pH 8.3)

1.25 M glycine (electrophoresis grade) (pH 8.3)

0.5 % SDS

- Staining solution with Coomassie Brilliant Blue for Protein

Dissolve 0.25 g of Coomassie Brilliant Blue R250 in 90 ml of methanol:H<sub>2</sub>O (1:1v/v) and 10 ml of glacial acetic acid. Filter the solution through a Whatman No. 1 filter to remove any particulate matter.

- Destaining Solution for Coomassie Stain

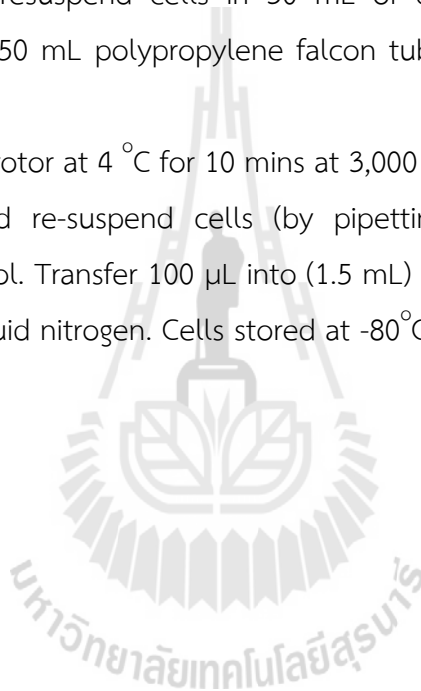
30% methanol

10% acetic acid

dH<sub>2</sub>O is added to bring volume to 100 ml.

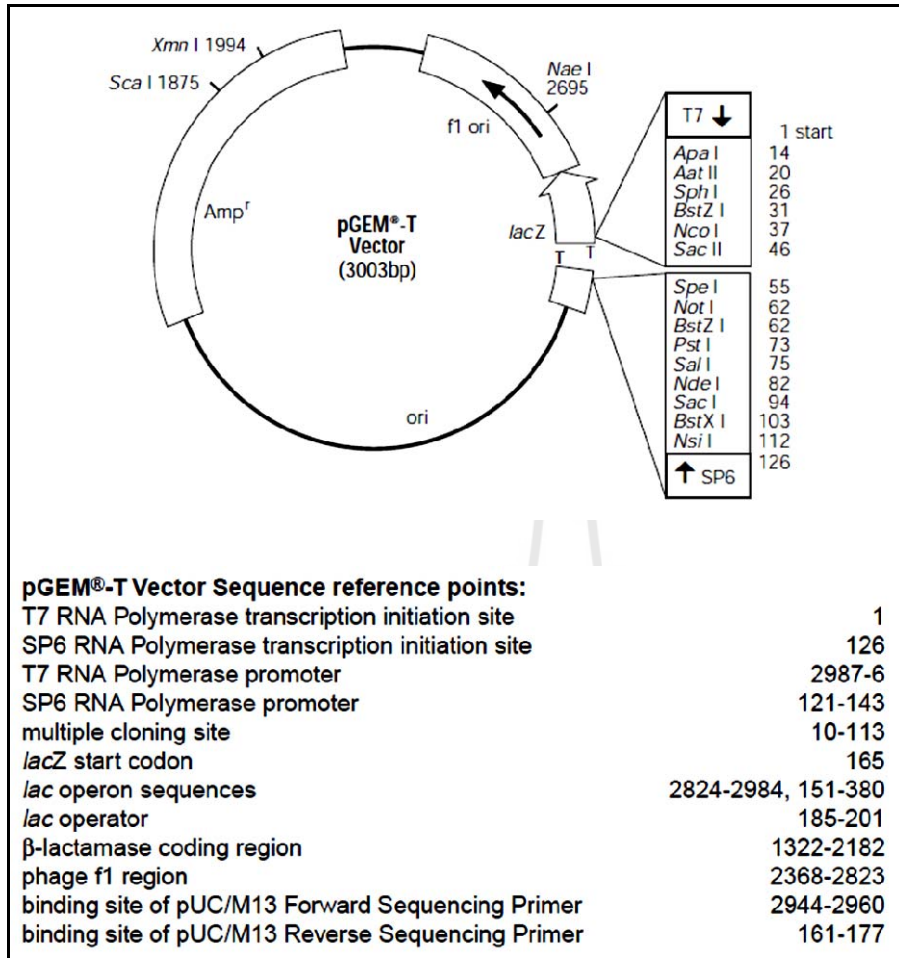
### 1.3. Preparation of competent cells

1. Streak *E. coli* host cells on an LB plate+100 µg/ml Amp)
2. Allow cells to grow at 37°C overnight
3. Place one colony in 10 mL LB media (+antibiotic selection if necessary), grow overnight at 37°C
4. Transfer 5 mL overnight DH5a culture into 500 mL LB media in 2-L flask
5. Allow cell to grow at 37°C (250 rpm), until OD<sub>600</sub>= 0.6 (~2-3 hours)
6. Transfer cells to 2 centrifuge bottles (250 mL), and place cells on ice for 20 mins
7. Centrifuge cells in Sorval GSA rotor at 4°C for 10 mins at 3,000 g (2500 rpm). Cells must remain cold for the rest of the procedure
8. Pour off media and resuspend cells in 30 mL of cold 0.1 M CaCl<sub>2</sub>. Transfer the suspended cells into 50 mL polypropylene falcon tubes, and incubate on ice for 30 mins
9. Centrifuge cells using rotor at 4 °C for 10 mins at 3,000 g
10. Pour supernatant and re-suspend cells (by pipetting) in 8 mL cold 0.1M CaCl<sub>2</sub> containing 15% glycerol. Transfer 100 µL into (1.5 mL) Eppendorff tubes placed on ice. Freeze the cells in liquid nitrogen. Cells stored at -80°C can be used for transformation for up to ~6 months.



ภาคผนวก ข

- แผนที่พลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T cloning vector



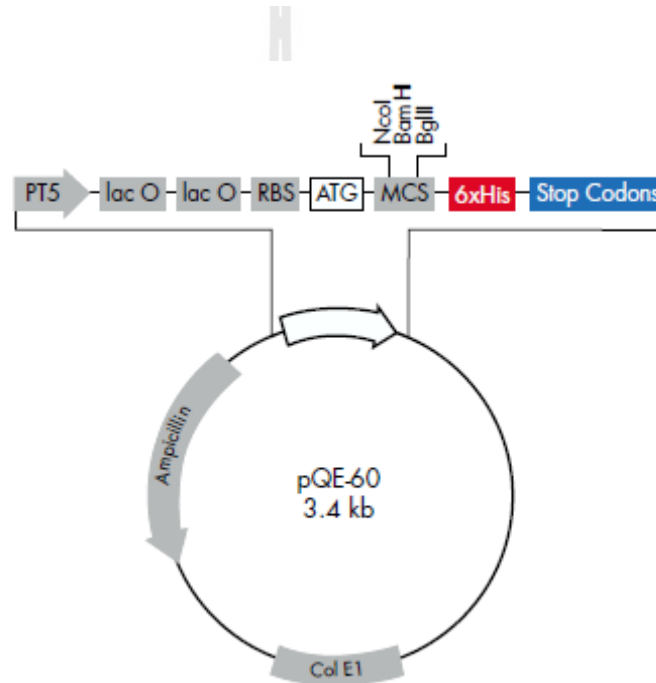


- แผนที่พลาสมิด pQE60 expression vector

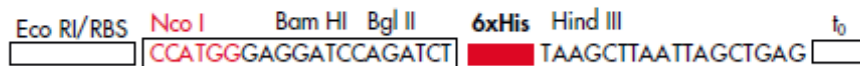
### pQE-60 Vector

#### Positions of elements in bases

Vector size (bp)	3431
Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	133-150
Multiple cloning site	113-132
Lambda <i>t</i> <sub>0</sub> transcriptional termination region	173-267
<i>rrnB</i> T1 transcriptional termination region	1033-1131
ColE1 origin of replication	1608
β-lactamase coding sequence	3226-2366



### pQE-60



ภาคผนวก ค  
ผลงานตีพิมพ์และการเผยแพร่

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน
  - Suginta W\*, Chuenark D, Masuhara M & Fukamizo T (2010) Novel  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. BMC Biochem. 11:40. (Highly accessed) (IF2011 = 2.0)
2. ผลงานนำเสนอในรูปแบบบรรยายหรือโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 2 ผลงาน
  - Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T & Suginta W. Novel  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p56. Poster presentation.
  - Chuenark D, Prinz & Suginta W. Cloning, expression, and characterization of two zincin-like fold containing chitobias from *Vibrio harveyi*. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P73, Poster presentation.

**ภาคผนวก ง**  
**ประวัตินักวิจัย**

Name	(ไทย) วิภา สุจินต์ (English) Wipa Suginta
Affiliation	(ไทย) กลุ่มวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา 30000  (English) School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand Tel: +66 44 22 4313; E-mail <a href="mailto:wipa@sut.ac.th">wipa@sut.ac.th</a>
Degree	Ph.D. (Biochemistry), The University of Edinburgh, UK  M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand B.Sc. (Genetics), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
Marital status	Married with one child
Current Position	Associate Professor in Biochemistry

**Fellowships/Awards (year 2000 - present)**

2009-2012	“Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers” from Alexander von Humboldt Foundation, Germany
2010	รางวัลพนักงานดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2553 สายวิชาการ <u>ด้านการวิจัย</u> มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2006	Suranaree University of Technology Award for “Outstanding Academic Performance in Science”
2005	“For Women in Science Fellowship” from L’OREAL (Thailand)/UNESCO.
2004	A “General Travel Grant” from The Biochemical Society, United Kingdom.
2003	“DAAD Fellowship” from the German Academic Exchange Service (DAAD), Germany.
1999-2000	Wellcome Trust fellowship for Postdoctoral Research Study at Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.

**Research Interest**

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

## List of publications

## Peer-reviewed articles

1. **Suginta W\***, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A & Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. Submitted to J Biol Chem.
2. **Suginta W\***, Chumjan W, Mahendran KR, Janning P, Schulte A & Winterhalter A. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. PLoS One. In Press (Doi 10.1371/journal.pone.0055126) (IF2011 = 4.091)
3. **Suginta W\*** & Sritho N. (2012) Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. Biosci Biotech Biochem. 76, 2275-2281. (IF2011 = 1.32)
4. Sritho N & **Suginta W\*** (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. App Biochem Biotech, 166, 1192–1202. (IF2011 = 1.943)
5. **Suginta W\*** & Sritho N &. (2012) Additional roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A.
6. Sritho N & **Suginta W\*** (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. App Biochem Biotech, 166:1192–1202. (IF2010 = 1.88).
7. Pantoom S, Vetter I, Prinz, H & **Suginta W\*** (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. J Biol Chem. 286, 24312-24323. (IF2010 = 5.328)
8. **Suginta W\***, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H\*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *BpsOmp38* from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. BBA-Biomembr. 1808, 1552-1559 (IF2010 = 4.647)
9. **Suginta W\***, Chuenark D, Masuhara M & Fukamizo T (2010) Novel  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. BMC Biochem. 11:40. (Highly accessed) (Unofficial IF2009 = 2.8)
10. Schulte A, Ruamchan S & Khunkaewla P, **Suginta W\*** (2009) The outer membrane protein *VhOmp* from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. J Membr Biol. 230, 101-111. (IF2009 = 1.63)

11. Suginta W\*, Pantoom S & Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. *J Chem Biol.* 2, 191-202.
12. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & Suginta W\* (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. *J Struct Biol.* 162, 491-499. (IF2009 = 3.497)
13. Pantoom S, Songsiriritthigul C & Suginta W\* (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC-Biochem.* 9:2. (unofficial IF = 2.8)
14. Suginta W\*, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA-General Subjects.* 1770, 1151-1160. (IF2010 = 4.663)
15. Suginta W\* (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme MicrobTech.* 41, 212-220. (IF2010 = 2.287)
16. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H & Suginta W\* (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *Acta Cryst. Section F.* 61, 895-898. (IF2009 = 0.55)
17. Suginta W\*, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376-3386. (IF2010 = 3.129)
18. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & Suginta W\* (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem J.* 384, 609-617. (IF2009 = 5.155)
19. Suginta W\*, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch Biochem Biophys.* 424, 171-180. (IF2010 = 3.022)
20. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & Suginta W\* (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem J.* 377, 579-587. (IF2010 = 5.155)

21. Suginta W, Karoulias N, Aitkin A & Ashley RH\* (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem J.* 359, 55-64. (IF2010 = 5.155)
22. Suginta W, Robertson PAW, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA\* (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J Appl Microbiol.* 89, 76-84. (IF2010 = 2.365)
23. 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.
24. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, Suginta W, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E\* (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
25. Suginta W & Svasti MRJ\* (1995) Purification and Properties of  $\beta$ -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. altissima. *ScienceAsia* 21, 183-186.
26. Suginta W & Svasti J\* (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
27. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, Suginta W, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* 21, 293-303.

หมายเหตุ เครื่องหมาย \* แสดงผู้เขียนเป็น Corresponding author