บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การกลายพันธุ์ การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์

ทำการกลายพันธุ์โดยเทคนิค PCR site-directed mutagenesis โดยใช้ QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (QIAGEN) และใช้ wild-type *chitinase A* DNA ที่โคลนอยู่ใน pQE60 expression vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเพื่อสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด singlemutant ดังนี้ S33A/W, W70A, W168G, Y171G, W231A, Y245A/W, W275G, E315M/Q, D392K/N, W397F และ W570G ส่วน double mutant ได้แก่ W397F/W570G triple mutant ได้แก่ W397F/W570G/ W275G) และ quadruple mutant ได้แก่ W397F/W570G/W275G/Y171G ดังอธิบายโดย Suginta et al. (2007)

หลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนด้วยการทำ automated DNA sequencing (BSU, ประเทศไทย) และวิเคราะห์ข้อมูลของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมใน DNASTAR package (DNASTAR, Inc., Madison, USA) ทำการ express รีคอมบิแนนท์ไคติเนส เอ ดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB/100 μg/ml ampicillin ที่ 25 °C จนได้ OD_{600} ประมาณ 0.6 ทำการ induce เซลล์ด้วย 0.5 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) ที่ 25 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °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 นำส่วนใสที่ได้หลังการปั่นตกตะกอนด้วยวิธีโครมาโตรกราฟฟีแบบจับจำเพาะโดยใช้ Ni-NTA agarose เป็นตัวจับ หลังจากล้างคอลัมน์ด้วย 5 mM imidazole ตามด้วย 10 mM imidazole ทำการชะเอาโปรตีนที่จับอยู่กับ Ni^{2+} ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970) ทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีนไคติเนสที่ตำแหน่ง 63 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (M_r 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's (Bradford, 1974) แล้วนำโปรตีนมาศึกษาหน้าที่ โครงสร้าง หรือเก็บที่ -30°C ใน 15% กลีเซอรอล จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

2.2. การหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคติเนส

หาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้ pNP-$GlcNAc_2$ เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาใน 96-well microtiter plate ทำปฏิกิริยา 100-µl ที่ประกอบด้วย10 µl เอนไซม์ 500 µM *p*NP-$(GlcNAc)_2$ และ 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1.0 M Na_2CO_3 (50 µl) แล้ววัดหาปริมาณ *p*-nitrophenol (*p*NP) ที่ค่าดูดกลืนแสง A_{405} แล้วคำนวณความเข้มข้นของ *p*NP ด้วยกราฟมาตรฐานของ *p*NP ที่สร้างขึ้นที่ช่วง 0-30 nmol อีกวิธีหนึ่งคือการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยวิธี reducing-sugar assay โดยทำปฏิกิริยา 500 µl ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) colloidal chitin ใน 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 และ 100 µg เอนไซม์ที่ 37°C ในเครื่องเขย่า Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเอาส่วนของไคตินออกด้วยความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส 200 µl มาทำปฏิกิริยาตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ตามวิธีของ Bruce *et al.* (1995) แล้ววัดหาปริมาณน้ำตาลที่ทำปฏิกิริยาที่ค่าดูดกลืนแสง A_{585} โดยใช้กราฟมาตรฐานของ $GlcNAc_2$ ที่ช่วง 0-1.75 µmol เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วน crystalline α-chitin ทำวิธีเดียวกันกับ colloidal chitin แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาปริมาณ 400 µg (Pantoom et al., 2008)

2.3. การวิเคราะห์หาน้ำตาลโดยเทคนิค TLC

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (NAG_2-NAG_6) ของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและไคติเนสกลายพันธุ์ ในปริมาตร 20 µl โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ที่มี 2.5 mM สับสเตรท และ 200 ng เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 0, 2.5, 5, 10, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 5 µl นำไปวิเคราะห์หาผลิตผลที่เกิดขึ้นด้วยวิธี thin layer chromatography โดยใช้แผ่น silica TLC plate ขนาด 5.0 ซม × 6.0 ซม เป็น stationary phase และมี mobile phase ที่ประกอบด้วย *n*-butanol:methanol: 30% ammonia solution:H_2O (10:8:4:2) (v/v) หลังจากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลาย aniline–diphenylamine reagent แล้วอบที่ 120 °C เป็นเวลา 5–10 นาที (Suginta et al., 2007)

2.4. การแยกและวิเคราะห์น้ำตาลโดยเทคนิค HPLC MS

ทำปฏิกิริยาการสลายน้ำตาล NAG_5 และ NAG_6 ในปริมาตร 50 µl ที่ประกอบด้วย 500 µM สับสเตรท 100 ng เอนไซม์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 0, 3, 7, 20, 30, 60 และ 180 นาที ณ เวลาต่าง ๆ ทำการ aliquot สารละลาย 10 µl ลงใน 200- µl vial แล้วนำไปแยกด้วยHPLC ที่ต่อกับเครื่อง ESI/MS โดยคอลัมน์ที่ใช้คือ Hypercarb®column (ThermoQuest, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) ขนาด 150 × 2.1 mm 5 µm ทำ

การ run คอลัมน์ที่อุณหภูมิ 10 °C ที่ flow rate เท่ากับ 0.4 ml/min ทำการชะน้ำตาลออกจากคอลัมน์ด้วย 5-70% gradient ของ acetonitrile ที่มี 0.1% formic acid คำนวณหา β/α ratios จากพื้นที่ใต้ peak ของน้ำตาลต่าง ๆ ส่วนการวิเคราะห์หามวลในเครื่อง electrospray MS ใช้โหมด positive full scan โดยเลือกช่วงของ mass-to-charge ratio (*m/z*) ระหว่าง 200-1,400 หลังจากนั้นทำการเพิ่ม signal-to-noise ratios ด้วยการเปลี่ยนโหมดในการวิเคราะห์เป็น single ion monitoring mode โดยเลือก *m/z* 424.5 สำหรับ NAG_2, *m/z* 627.5 สำหรับ NAG_3, *m/z* 830.3 สำหรับ NAG_3, *m/z* 1034.16 สำหรับ NAG_5 สำหรับ *m/z* 1236.3 สำหรับ NAG_6(Suginta et al., 2009)

2.5. การทำ Chitin Binding Assay

ทำการศึกษาการจับกับสับสเตรทด้วยวิธี chitin binding assay ทำปฏิกิริยา (500 µl) ประกอบด้วย 1.0 µmol เอนไซม์ และ 1.0 mg ไคติน ใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ที่เวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 นาที ที่ 0 °C เพื่อลดอัตราการสลายของสับสเตรทโดยเอนไซม์ ณ เวลาที่ต้องการทำการปั่นแยกเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับไคติน ด้วยความเร็ว 12000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ทำการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด (E_t) และเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (E_f) ในส่วนใสด้วยวิธี Bradford's แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับไคติน (E_b) จากสมการ $E_t = E_f + E_b$ ส่วนการหาค่า equilibrium adsorption isotherm ทำโดยบ่มเอนไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 7.0 µM ที่อุณหภูมิ 0 °C กับ 1.0 mg ของไคตินชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นแยกส่วนใสที่มีเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับไคตินด้วยความเร็ว 12,000 xg แล้วนำมาวัดค่า โปรตีนด้วยวิธี Bradford แล้วสร้างกราฟระหว่าง [E_b] vs [E_f] เพื่อหาค่า dissociation binding constants (K_d) ของเอนไซม์ wild-type เทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์โดยฟังก์ชัน non-linear regression ใน GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) (Pantoom et al., 2008)

2.6. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

ทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส โดยวิธี colorimetric assay โดยในปฏิกิริยา 100 µl ประกอบด้วย 0–500 µM *p*NP-$GlcNAc_2$ ในสารละลาย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 และ dH_2O โดยทำการ pre-incubate ของเหลวใน microtiterplate ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 400 ng และบ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 50 µl 1 M Na_2CO_3 ทำการวัดหาปริมาณ *p*NP ที่เกิดขึ้นโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ A_{405} และสร้างกราฟมาตรฐานของ *p*NP ในช่วง 0–30 nmol ต่อจากนั้นทำการคำนวณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ เช่นค่า K_m ค่า V_{max} ค่า k_{cat} จากการทดลองซ้ำสามครั้ง โดยใช้ฟังก์ชัน nonlinear regression จากโปรแกรม GraphPad Prism ส่วนการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ด้วยน้ำตาล chitohexaose และ colloidal chitin ใช้วิธี DMAB assay โดยทำปฏิกิริยา 200 µl ที่มี 0-500 µM NAG_6 กับ 50 µg เอนไซม์ ใน 100 mM sodium

acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำปริมาตรทั้งหมดในปฏิกิริยามาวัดหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ส่วน colloidal chitin ใช้วิธีเดียวกันกับน้ำตาล chitohexaose แต่ใช้ความเข้มข้น 0 to 5.0 % (w/v) ทำการวัดผลิตผลน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาล $GlcNAc_2$ ที่ช่วง 0-1.75 µmol และหาค่าทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ จาก ฟังก์ชัน nonlinear regression (Pantoom et al., 2008)

2.7. การทำ homology modeling

นำลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* (UniProtKB/TrEMBL accession number Q9AMP1) submit เข้าไปใน Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/) เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โดยใช้โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์ E315L จากเชื้อ *S. marcescens* กับ hexaNAG (PDB code: 1NH6) เป็นโครงสร้างต้นแบบ และแสดงโครงสร้างที่ทำนายได้ด้วยโปรแกรม Pymol (www.pymol.org) ทำการหาตำแหน่งของกรดอะมิที่บริเวณเร่งโดย superimpose กรดอะมิโน 459 ตัวของโครงสร้างที่ทำนายได้ของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio* กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันกับเอนไซม์ของ *Serratia* แล้ว dock น้ำตาล hexaNAG เข้ากับบริเวณเร่งของเอนไซม์จาก *Vibrio* ด้วยโปรแกรม Superpose ใน CCP4 suit package (Collaborative Computational Project, 1994)