

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. การวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนของโปรตีน PhyA170 ที่จะศึกษา

จากรายงานการวิจัยของ Tomschy และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นโครงสร้างต้นแบบในการวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ phytase จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เพื่อที่จะจำแนกหากรดอะมิโนที่อาจจะมีส่วนช่วยในการเพิ่ม catalytic activity ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดย Tomschy และคณะ ได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 (ตรงกับกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170) เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 (กรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170) มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะต่อค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และความหลากหลายต่อสับสเตรตของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดยเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 เป็น Leucine พบว่าเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของการทำปฏิกิริยากับสับสเตรต phytic acid ที่ pH 5.0 สูงขึ้น 4 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* ดั้งเดิม นอกจากนี้ผลจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น พบว่าเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรตชนิดอื่น ณ ที่ ระดับ pH อื่น

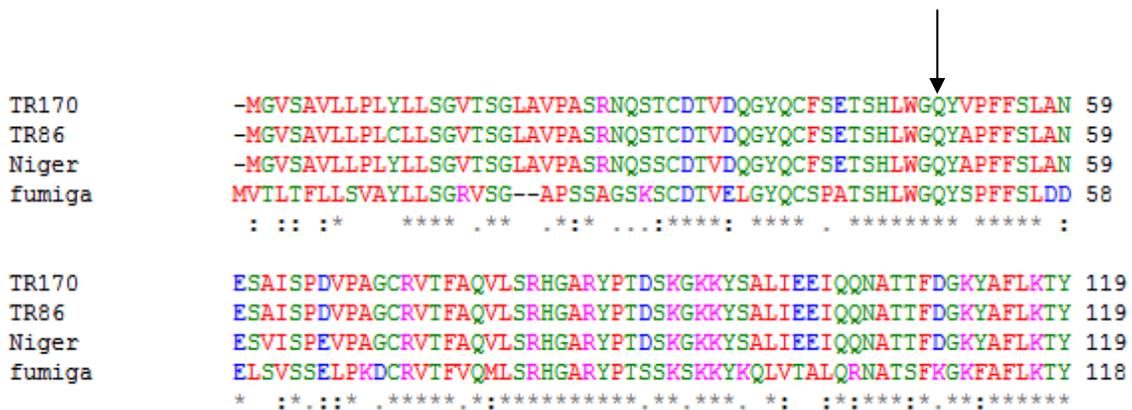
ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพื่อศึกษาความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จึงได้เลือกเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 (Q50) เพื่อศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนตำแหน่ง

นี้ว่ามีความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 อย่างไร

โดยจากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. niger* TR170 *A. fumigatus* *A. japonicus* TR86 และ *A. niger* NRRL 3135 (เป็นสายพันธุ์ที่ทราบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase แล้ว) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> พบว่าเอนไซม์ phytases ที่ต้องการศึกษา จากเชื้อรา *A. niger* TR170 มีกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 เช่นเดียวกับเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดยผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงในภาพที่ 4.1

ภาพที่ 4.1

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อรา 4 สายพันธุ์

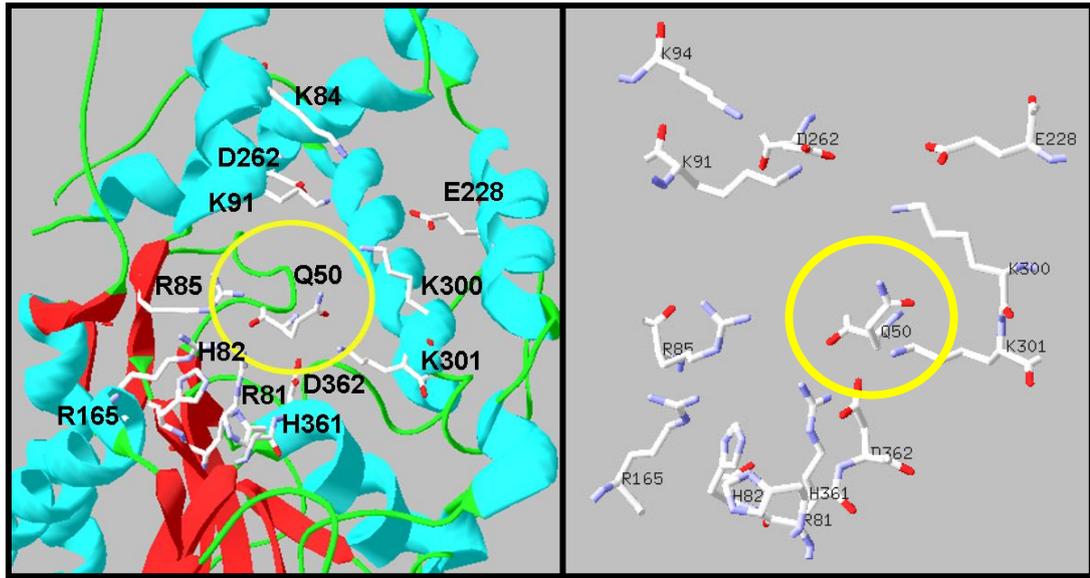


โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือ กรดอะมิโน Glutamine ที่ 50 (Q50)

จากการจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นโครงสร้างต้นแบบ พบว่ากรดอะมิโน Q50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จะอยู่ใกล้กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณส่วน active site ของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยส่วนของบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ได้แก่ R81 H82 R85 R165 H361 และ D362 (Kostrewa et al. 1997) และ บริเวณที่จับกับสารตั้งต้น (substrate binding site) ได้แก่ K91 K94 E228 D262 K300 และ K301 (Mullaney et al. 2002)

ภาพที่ 4.2

โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นโครงสร้างต้นแบบ



ดังนั้น จึงมีความคาดหวังว่ากรดอะมิโน Q50 อาจจะเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จึงได้เลือกเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Q50 ซึ่งมีหมู่ข้างที่ไม่มีประจุแต่มีขั้ว ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น 9 ชนิด ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1

ชนิดกรดอะมิโนทั้ง 9 ชนิด และคุณสมบัติที่ต้องการเปลี่ยนแปลง

ชนิดของกรดอะมิโน	คุณสมบัติ
Alanine	ขนาดของกรดอะมิโนเล็กกลางและมีคุณสมบัติทางเคมีเป็น hydrophobic
Glycine	ขนาดของกรดอะมิโนเล็กกลางและมีคุณสมบัติทางเคมีเป็น hydrophobic
Isoleucine	มีคุณสมบัติทางเคมีเป็น hydrophobic
Leucine	มีคุณสมบัติทางเคมีเป็น hydrophobic
Asparagine	ขนาดกรดอะมิโนให้เล็กกลางและมีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนเดิม
Proline	โครงสร้างของหมู่อำมีลักษณะเป็นวงและมีคุณสมบัติทางเคมีเป็น hydrophobic
Serine	ขนาดของกรดอะมิโนเล็กกลางและมีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนเดิม
Threonine	ขนาดของกรดอะมิโนเล็กกลางและมีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนเดิม
Valine	ขนาดของกรดอะมิโนเล็กกลางและมีคุณสมบัติทางเคมีเป็น hydrophobic

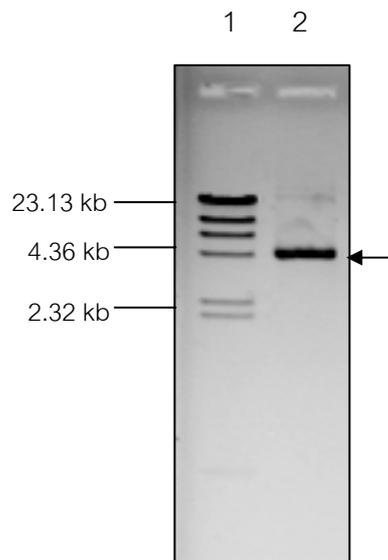
ดังนั้นในการศึกษานี้มีการสังเคราะห์ยีน phyA170 กลายซึ่งแสดงออกเป็นโปรตีน กลายทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ โปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V

4.2. การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสม pPICZ α -rPhyA170 จาก *E. coli* DH5 α

จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZ α -rPhyA170 จาก *E. coli* DH5 α เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน phyA170 กลายด้วย QIAprep spin miniprep kit แล้ววิเคราะห์ด้วย ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ดังภาพที่ 4.3 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 4 kb โดยเปรียบเทียบขนาดของซันดีเอ็นเอ Lamda DNA/*Hind*III marker (Fermentas) (100 ng) เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้มีลักษณะโครงสร้างเป็นวง ซึ่งขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZ α -rPhyA170 ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงจะมีขนาด ประมาณ 5 kb

ภาพที่ 4.3

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZ α -rPhyA170 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α



Lane ที่ 1: Lamda DNA/HindIII marker (Fermentas) (100 ng)

Lane ที่ 2: พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -rPhyA170

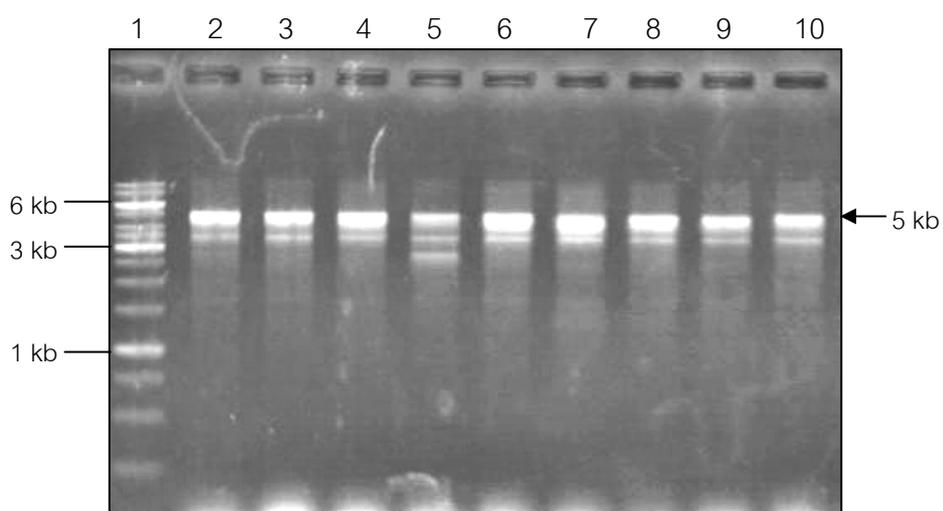
4.3. การทำเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งจำเพาะของยีน phyA170

เพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งจำเพาะต้องทำการเปลี่ยนแปลงรหัสนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะในยีน phyA170 โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZ α -rPhyA170 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำให้เกิดการกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis โดยวิธีพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ต้องการศึกษาให้เป็นกรดอะมิโนที่ต้องการ ซึ่งจะมีการกลายเพียง 2 ชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วให้ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ได้แก่ Q50L และ Q50T ซึ่งจะช่วยให้ในการใช้แยกความแตกต่างระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -rPhyA170 ต้นแบบ กับ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาด

ของชิ้นดีเอ็นเอกับ DNA marker Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากทุกคู่ไพรเมอร์มีขนาดประมาณ 5 kb ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ และเพื่อเป็นการยืนยัน ว่าดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็นผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่ใช่พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ และไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งจำเพาะของยีน phyA170 สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ จึงใช้เอนไซม์ *DpnI* ซึ่งสามารถตัดเฉพาะนิวคลีโอไทด์ที่มีการเติมหมู่เมทิลจากการเกิดปฏิกิริยา methylation เพื่อกำจัดพลาสมิดดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งมีการเกิดปฏิกิริยา methylation แต่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่เกิดปฏิกิริยา methylation จึงไม่มีการเติมหมู่เมทิล จึงไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *DpnI* ดังนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ DNA marker Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) จะพบชิ้นดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดประมาณ 5 kb เท่ากับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ก่อนถูกตัดด้วยเอนไซม์ *DpnI* ดังแสดงในภาพที่ 4.5

ภาพที่ 4.4

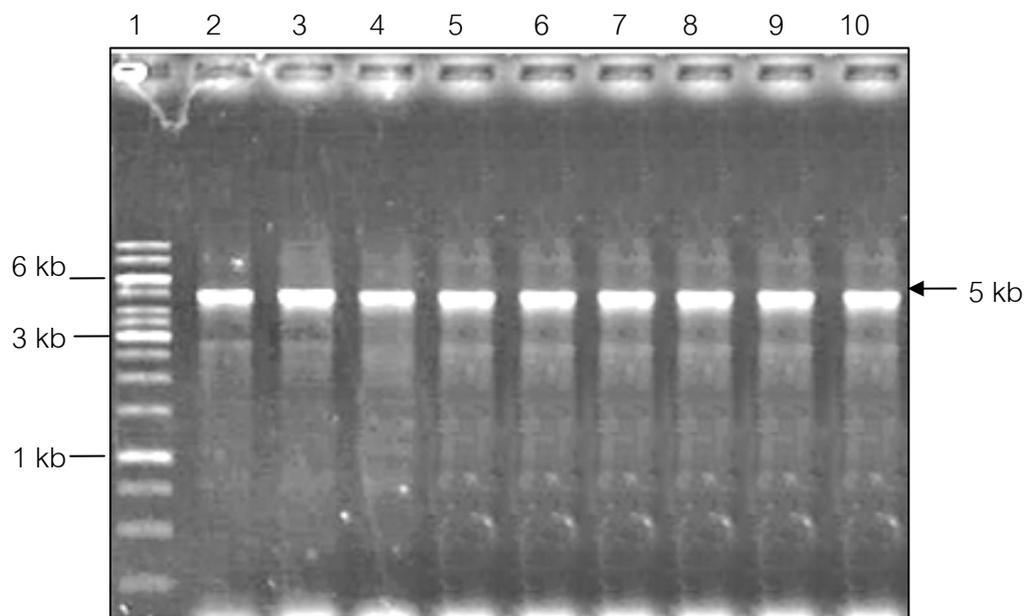
ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ pPICZαA-mPhyA170 ที่มีการกลายในตำแหน่งจำเพาะที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis โดยวิธีพีซีอาร์



- Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)
- Lane ที่ 2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50A_f และ Q50A_r
- Lane ที่ 3 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50G_f และ Q50G_r
- Lane ที่ 4 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50I_f และ Q50I_r
- Lane ที่ 5 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50L_f และ Q50L_r
- Lane ที่ 6 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50N_f และ Q50N_r
- Lane ที่ 7 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50P_f และ Q50P_r
- Lane ที่ 8 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50S_f และ Q50S_r
- Lane ที่ 9 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50T_f และ Q50T_r
- Lane ที่ 10 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50V_f และ Q50V_r

ภาพที่ 4.5

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZα-mPhyA170 ที่มีการกลายในตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *DpnI* ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis โดยวิธีพีซีอาร์



- Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)
- Lane ที่ 2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50A_f และ Q50A_r
- Lane ที่ 3 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50G_f และ Q50G_r
- Lane ที่ 4 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50I_f และ Q50I_r
- Lane ที่ 5 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50L_f และ Q50L_r
- Lane ที่ 6 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50N_f และ Q50N_r
- Lane ที่ 7 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50P_f และ Q50P_r
- Lane ที่ 8 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50S_f และ Q50S_r
- Lane ที่ 9 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50T_f และ Q50T_r
- Lane ที่ 10 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ Q50V_f และ Q50V_r

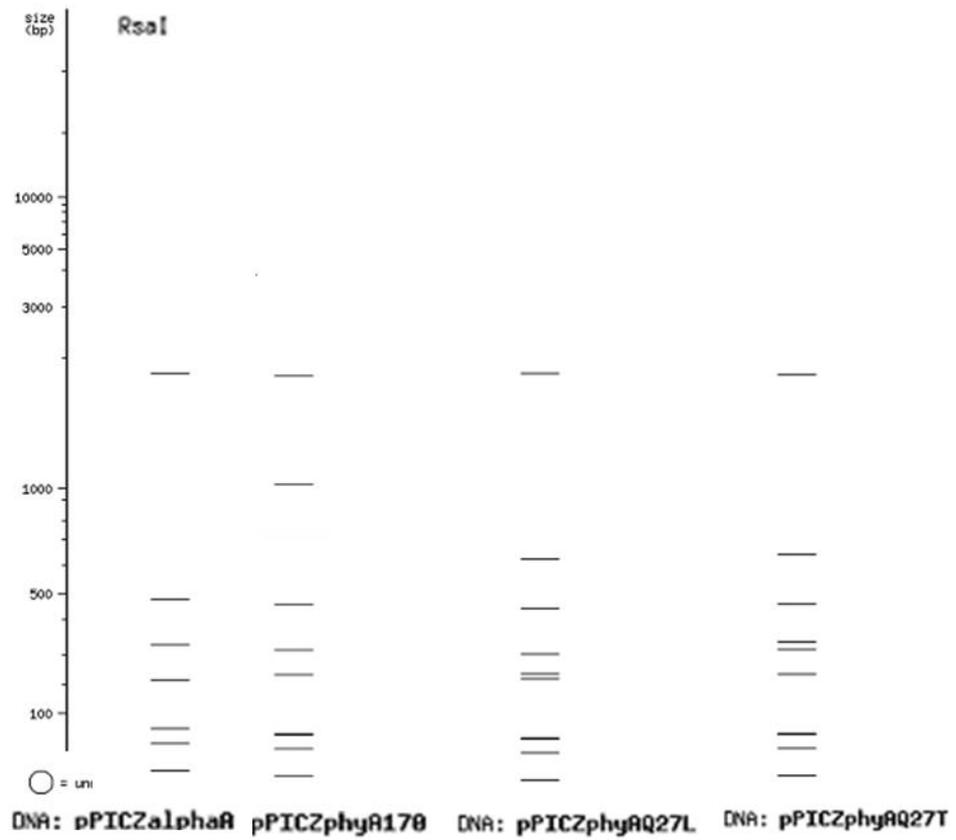
จากนั้นถ่ายขึ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้าสู่คอมพิวเตอร์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 โดยเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มี zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 แต่ละชนิด โดยในส่วนของตำแหน่ง Q50L และ Q50T จะสามารถตรวจสอบได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อน เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ และพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 กลาย จากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาดของดีเอ็นเอ โดยภาพที่ 4.6 แสดงภาพเจลจำลองของจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอหลังจากการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม NEBcuter v2.0 (Biolab) และผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แสดงได้ดังภาพที่ 4.7 ซึ่งพบว่าจำนวนชิ้นและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T มีขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอตรงกับผลที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NEBcuter v2.0 (Biolab)

ภาพที่ 4.6

ภาพเจลจำลองของจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอหลังจากการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

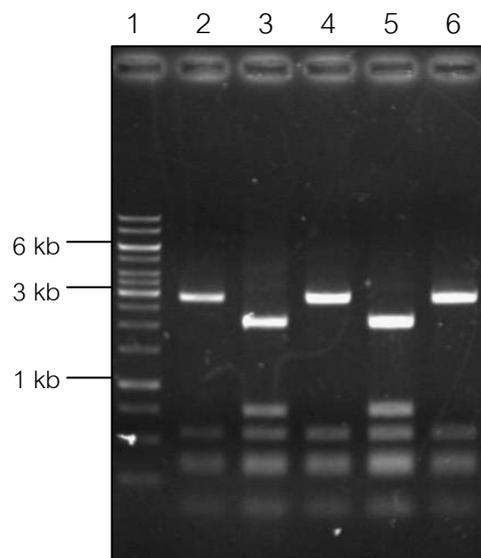
pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

*Rsa*I ด้วยโปรแกรม NEBcutter v2.0 (Biolab)



ภาพที่ 4.7

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ
pPICZ α -mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T
และพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -rPhyA170
ต้นแบบ ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ *Rsa*I



Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)

Lane ที่ 2 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -rPhyA170ต้นแบบ
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I

Lane ที่ 3 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 กลาย Q50L โคโลனிที่ 1
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I

Lane ที่ 4 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 กลาย Q50L โคโลனிที่ 2
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I

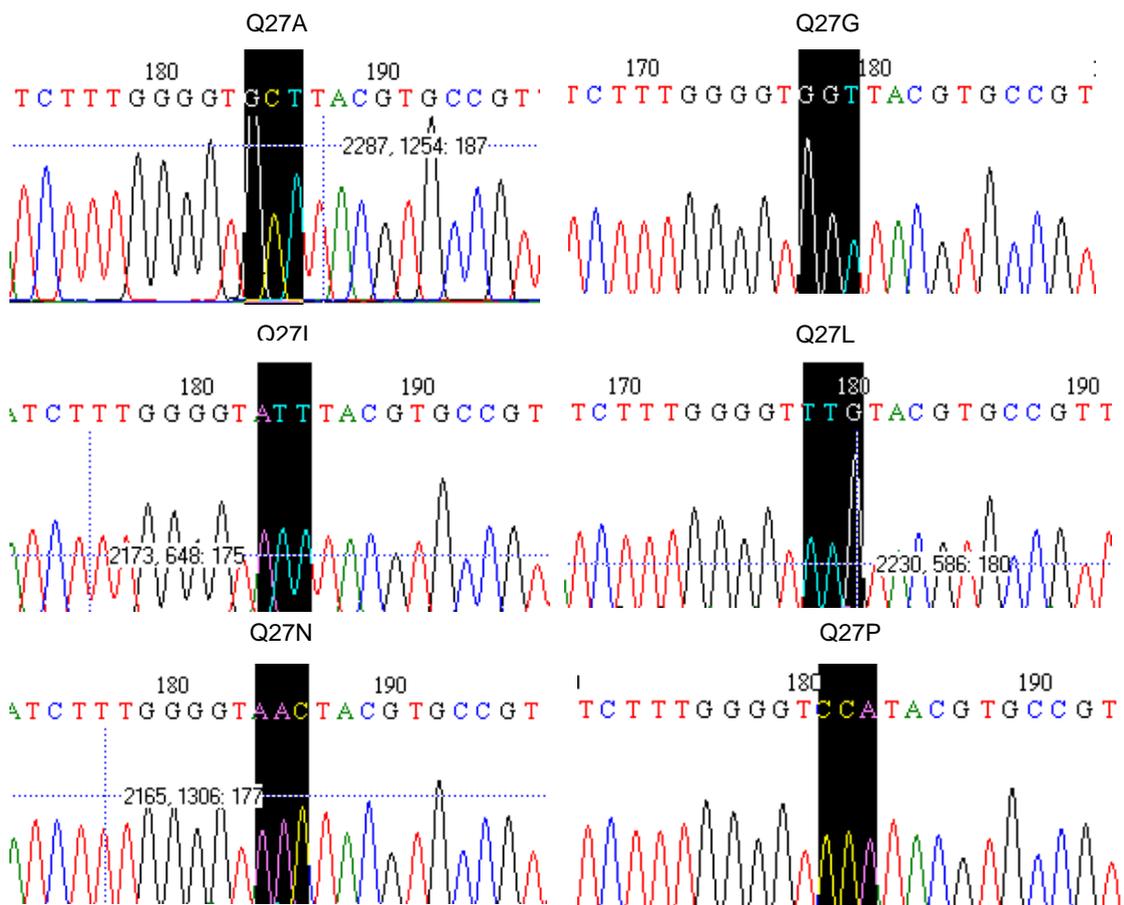
Lane ที่ 5 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 กลาย Q50T โคโลனிที่ 3
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I

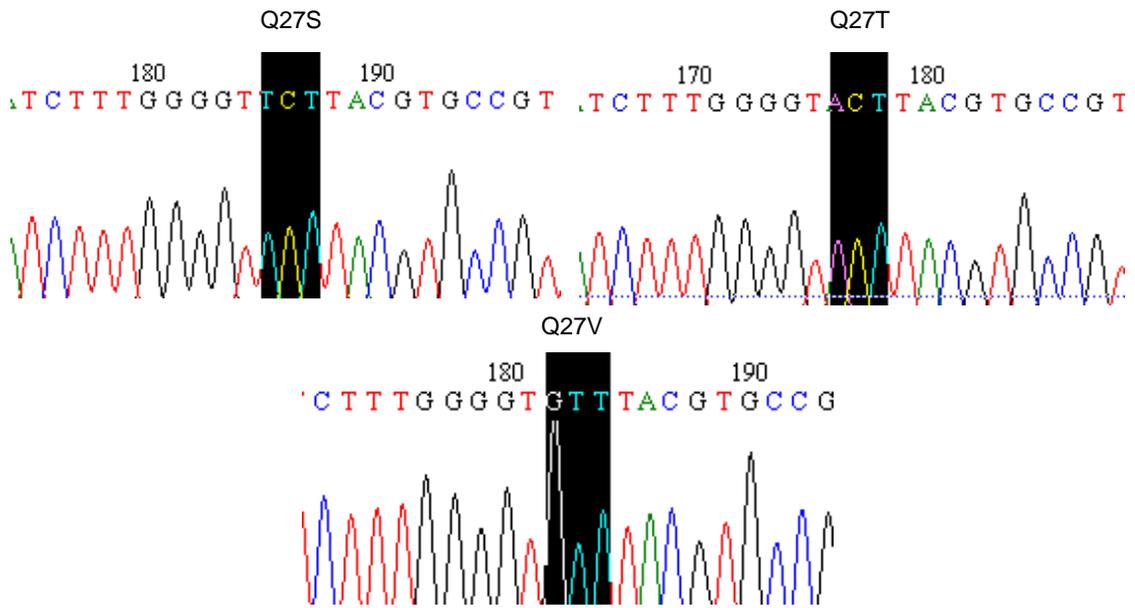
Lane ที่ 6 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 กลาย Q50T โคโลனிที่ 3
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I

จากนั้นนำโคลนของ Q50L และ Q50T ซึ่งได้จากการตรวจสอบด้วยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ โคลนของ Q50A Q50G Q50I Q50N Q50P Q50S และ Q50V ซึ่งไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดๆ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อตรวจสอบผลการกลายของยีน phyA170 เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับยีน phyA170 ดั้งเดิม โดยตำแหน่งที่ต้องการให้มีการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนในชนิดต่างๆ แสดงด้วยแถบสีดำ ดังแสดงในภาพที่ 4.8

ภาพที่ 4.8

ผลโครมาโทแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA170 กลาย ทั้ง 9 ชนิด เปรียบเทียบกับยีน phyA170 ดั้งเดิม แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนด้วยแถบสีดำ





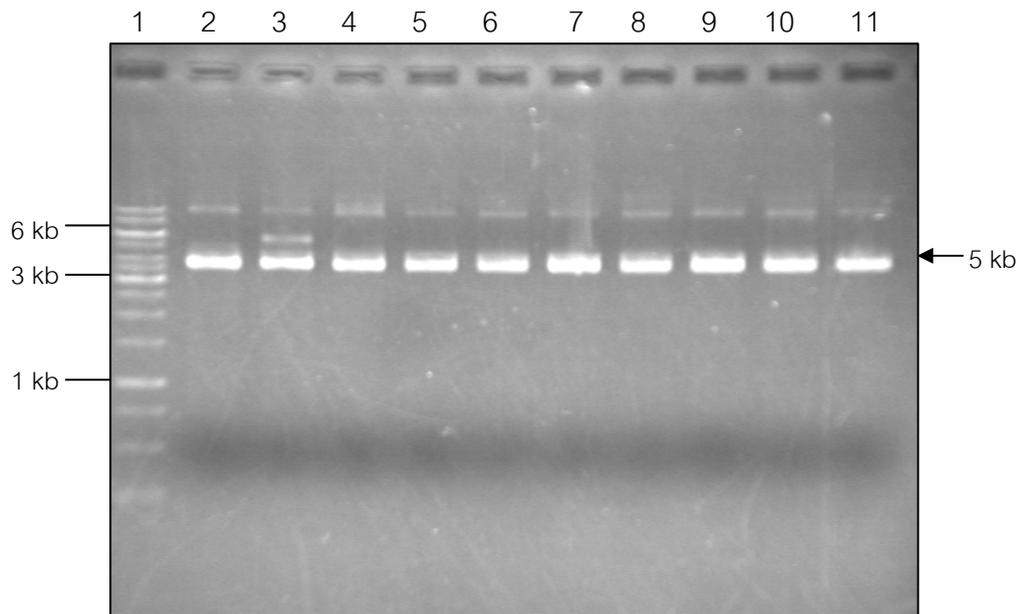
ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในภาคผนวก ค พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมีความถูกต้องแสดงว่าโคไลนีดังกล่าวเป็นโคไลนีที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA-mPhyA170 ปลาย

4.4. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายสำหรับการถ่ายเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris*

ในการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายสำหรับการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ต้องใช้ความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอประมาณ 5 ถึง 10 นาโนกรัม ดังนั้นจึงทำการเตรียมพลาสมิดให้ได้ปริมาณความเข้มข้นที่สูงโดยเลี้ยงโคไลนีเดี่ยวของ *E. coli* JM109 ที่บรรจุพลาสมิด pPICZαA ที่มียีน phyA170กลาย และยีน phyA170 ดั้งเดิม ในอาหารเหลว Luria-Betani (LB broth) 25 มิลลิลิตร ที่มี zeocin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep spin miniprep kit และวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ซึ่งพบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นเพียงพอในการนำไปใช้ในการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ดังภาพที่ 4.9

ภาพที่ 4.9

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 ทั้ง 9 ชนิด และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ



Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)

Lane ที่ 2 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ

Lane ที่ 3 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50A

Lane ที่ 4 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50G

Lane ที่ 5 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50I

Lane ที่ 6 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50L

Lane ที่ 7 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50N

Lane ที่ 8 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50P

Lane ที่ 9 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50S

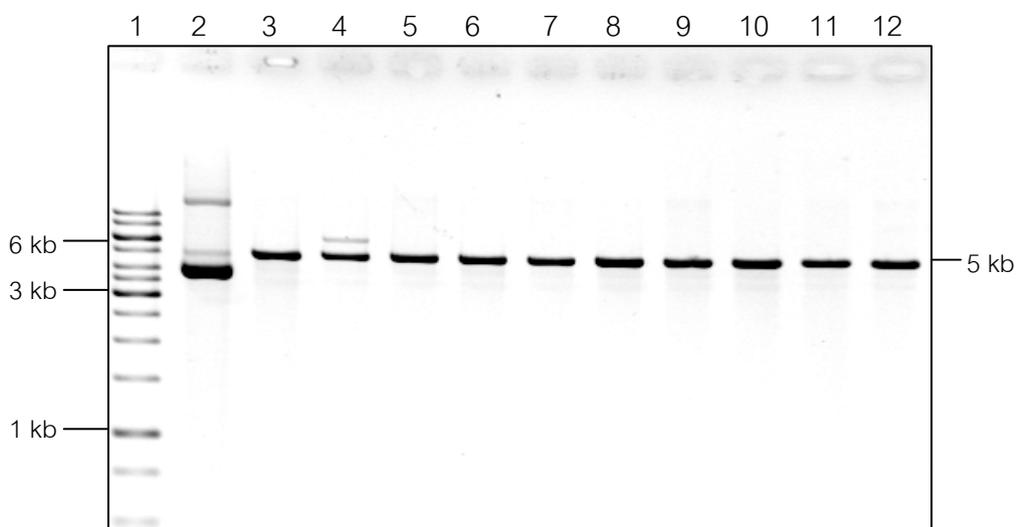
Lane ที่ 10 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50T

Lane ที่ 11 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50V

เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย และ pPICZαA-rPhyA170 มาทำการ linearized ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PmeI* ที่มีบริเวณจดจำอยู่ในพลาสมิด pPICZαA เพื่อใช้ในทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris* และวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) ดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่าแถบชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่า พลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นวงแหวนทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า พลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกย่อยซึ่งจะมีรูปร่างเป็นเส้นตรง โดยพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย สามารถทำการ linearized ได้ครบทั้ง 9 ชนิด

ภาพที่ 4.10

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ ที่ถูก linearized ด้วยเอนไซม์ *PmeI*



Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)

Lane ที่ 2 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ

Lane ที่ 3 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-rPhyA170 ต้นแบบ

ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*

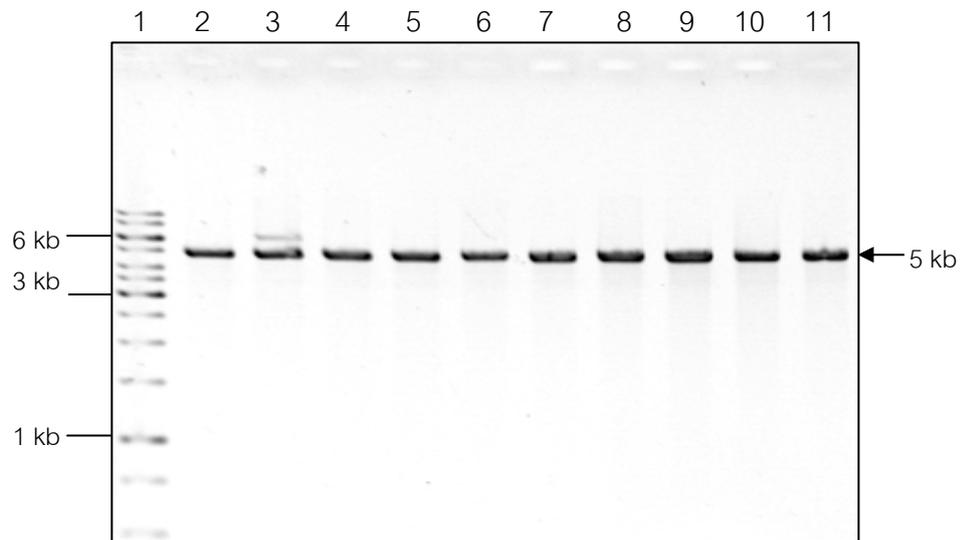
- Lane ที่ 4 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50A
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 5 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50G
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 6 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50I
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 7 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50L
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 8 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50N
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 9 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50P
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 10 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50S
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 11 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50T
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*
- Lane ที่ 12 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย Q50V
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PmeI*

4.5. การทำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการ linearized ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega)

ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA-mPhyA170 กลาย และ pPICZαA-rPhyA170 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ด้วยวิธี electroporation จะต้องทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการ linearized มีความบริสุทธิ์ก่อน เพื่อกำจัดสารต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอ เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งอาจรบกวนการทำ electroporation โดยใช้ชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega) จากนั้นนำมาวิเคราะห์อีกครั้ง ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) พบว่าแถบชิ้นดีเอ็นเอพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งหมดมีแถบเดียว จึงสามารถนำไปใช้ในการทรานสฟอร์มต่อไป ดังภาพที่ 4.11

ภาพที่ 4.11

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด และพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-rPhyA170 ต้นแบบ ที่ถูก linearized และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega)



Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)

Lane ที่ 2 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-rPhyA170 ต้นแบบ

Lane ที่ 3 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50A

Lane ที่ 4 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50G

Lane ที่ 5 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50I

Lane ที่ 6 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50L

Lane ที่ 7 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50N

Lane ที่ 8 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50P

Lane ที่ 9 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50S

Lane ที่ 10 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50T

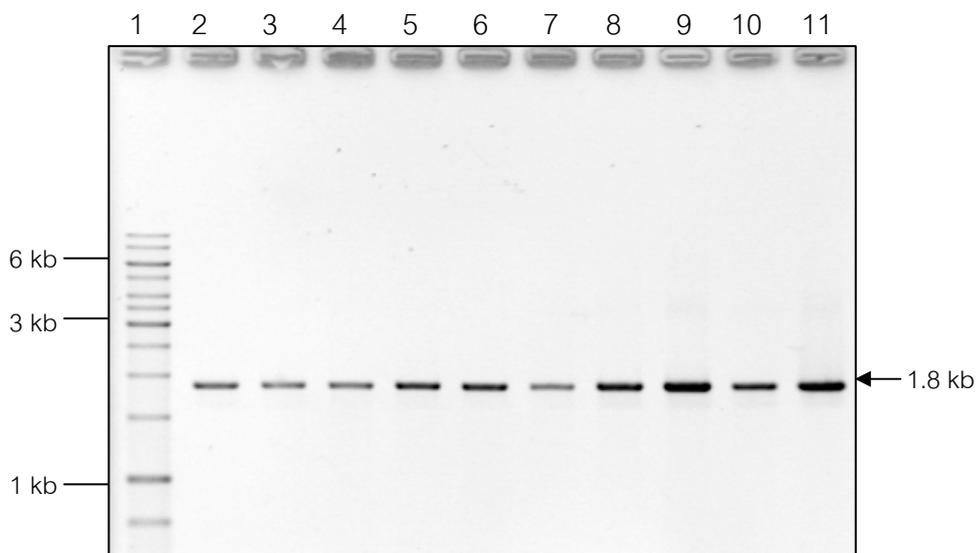
Lane ที่ 11 = พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α A-mPhyA170 กลาย Q50V

4.6. การตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายเข้าสู่โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์

เมื่อทำ pPICZ α -mPhyA170 กลาย และ pPICZ α -rPhyA170 ที่ผ่านการ linearized ให้บริสุทธิ์แล้ว จึงนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ด้วยวิธี electroporation ซึ่งผลการตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 กลาย และ pPICZ α -PhyA170 เข้าสู่โครโมโซมดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่าทุกชนิดการกลายปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกันประมาณ 1.8 kb ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับยีน phyA170 ดั้งเดิม แสดงว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZ α -mPhyA170 กลาย และ pPICZ α -PhyA170 สามารถแทรกตัวเข้าโครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* ได้สำเร็จ แสดงดังในภาพที่ 4.12

ภาพที่ 4.12

ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของการแทรกตัวของพลาสมิด pPICZ α -mPhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด และพลาสมิด pPICZ α -rPhyA170 ต้นแบบ เข้าสู่โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1

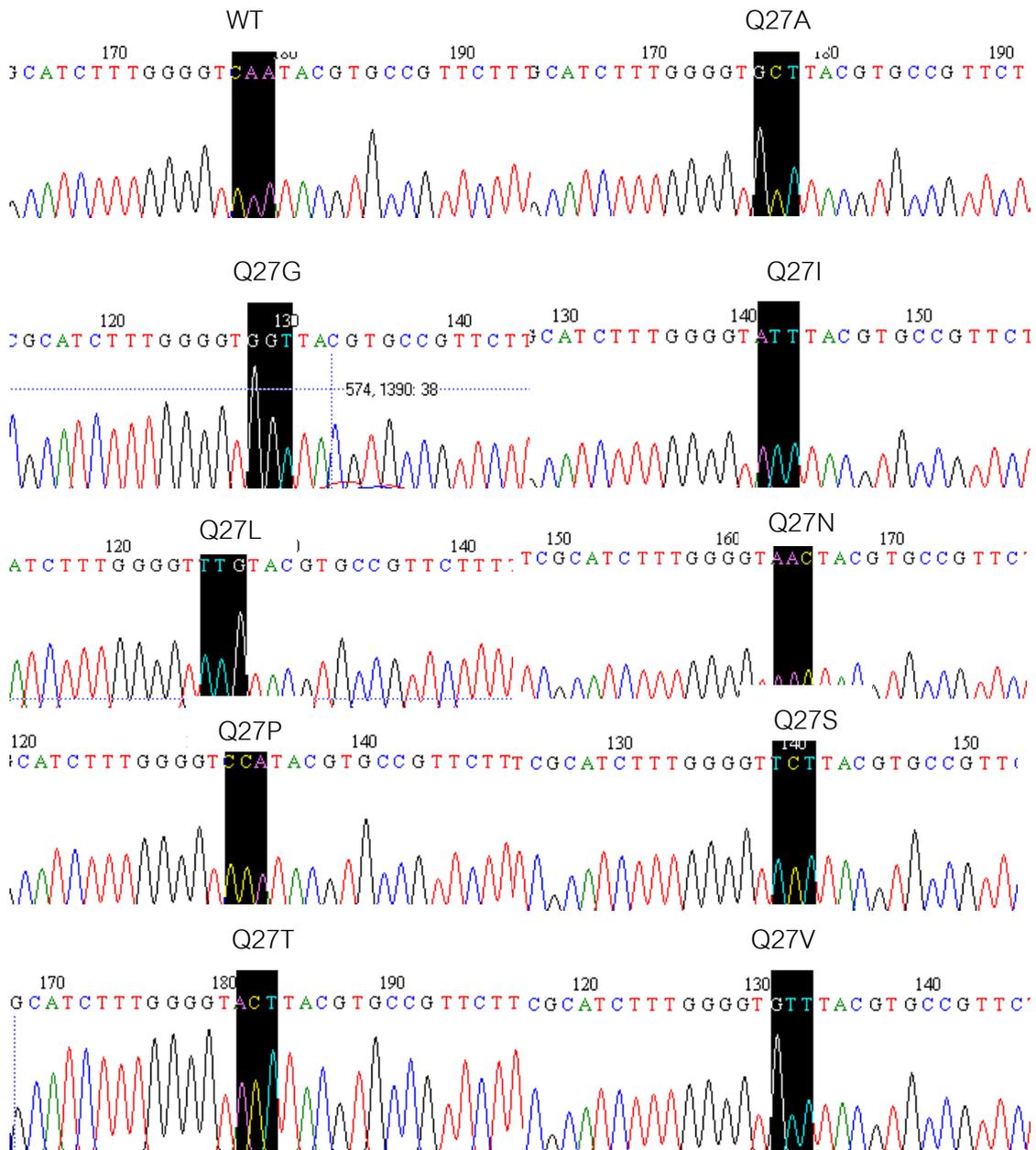


- Lane ที่ 1 = Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (100 ng)
Lane ที่ 2 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 ดั้งเดิม
Lane ที่ 3 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50A
Lane ที่ 4 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50G
Lane ที่ 5 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50I
Lane ที่ 6 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50L
Lane ที่ 7 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50N
Lane ที่ 8 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50P
Lane ที่ 9 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50S
Lane ที่ 10 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50T
Lane ที่ 11 = ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของยีน phyA170 กลาย Q50V

และนำโคลนที่คาดหมายว่า พลาสมิด pPICZαA-mPhyA170 กลาย และ pPICZαA-rPhyA170 สามารถแทรกตัวเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์ *P. pastoris* ได้สำเร็จ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง โดยตำแหน่งที่ต้องการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนแสดงด้วยแถบสีเทาที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.13 ทำให้ยืนยันได้ว่าพลาสมิด pPICZαA-mPhyA170 กลาย และ pPICZαA-rPhyA170 สามารถแทรกตัวเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์ *P. pastoris* ได้สำเร็จ

ภาพที่ 4.13

ผลโครมาโทแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด เปรียบเทียบกับยีน phyA170 ดั้งเดิม แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนด้วยแถบสีดำ

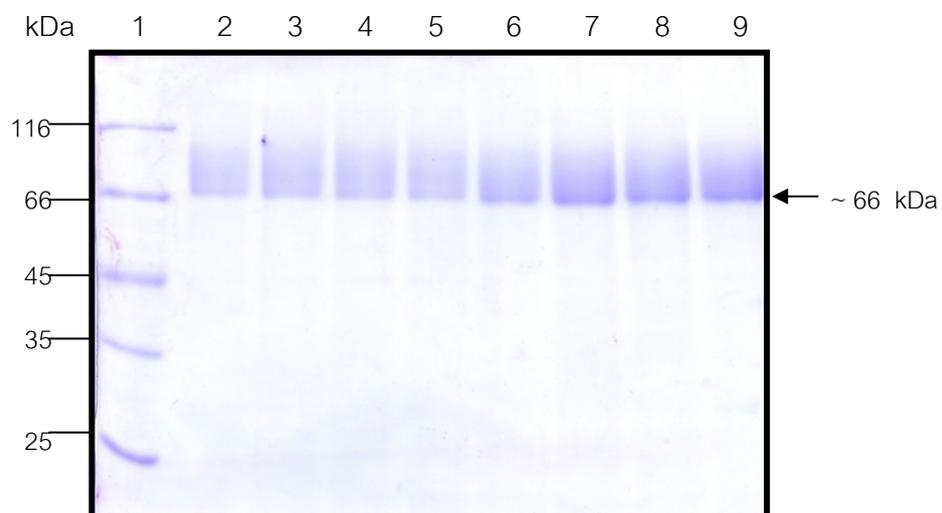


4.7. การตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ของยีสต์ *P. pastoris* ในระดับ small-scale

จากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 กลายและดั้งเดิมด้วยยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งได้รับพลาสมิดสายผสมกลาย (pPICZ α -mphyA170) และพลาสมิดสายผสมดั้งเดิม (pPICZ α -rphyA170) ในระดับ small-scale ผลการวิเคราะห์ด้วย 10% SDS-PAGE ดังภาพที่ 4.14 พบว่า โคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *P. pastoris* ที่บรรจุพลาสมิดสายผสมกลาย (pPICZ α -mphyA170) ทั้ง 9 ชนิด สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 กลาย ซึ่งมีขนาดประมาณ 66 kDa ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ดั้งเดิมที่ผลิตได้จากโคโลนีเดี่ยวของ ยีสต์ *P. pastoris* ที่บรรจุพลาสมิดสายผสมดั้งเดิม (pPICZ α -rphyA170) ซึ่งเป็น positive control ของการทดลอง ในขณะที่โคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *P. pastoris* บรรจุพลาสมิด pPICZA ซึ่งเป็น negative control ไม่พบโปรตีนใดๆ จากการวิเคราะห์จึงสันนิษฐานได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็นโปรตีน PhyA170 ดังนั้นจึงเลือกโคโลนีจากโคลนนิ่งกลายแต่ละชนิดที่สามารถผลิตโปรตีนได้ดีที่สุดเพื่อทำการผลิตโปรตีนในระดับ large scale

ภาพที่ 4.14

ผลการวิเคราะห์ 10% SDS-PAGE ของการแสดงออกของโปรตีน phyA170 ดั้งเดิมและโปรตีนกลาย จากรีคอมบิแนนท์เซลล์ *P. pastoris* ตั้งแต่วันที่ 1-4 ของการเพาะเลี้ยง โดยถูกครแสดงแถบโปรตีนขนาด 66 kDa



(ก) โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ที่บรรจุพลาสมิด pPICZ α -rphyA170

Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 3

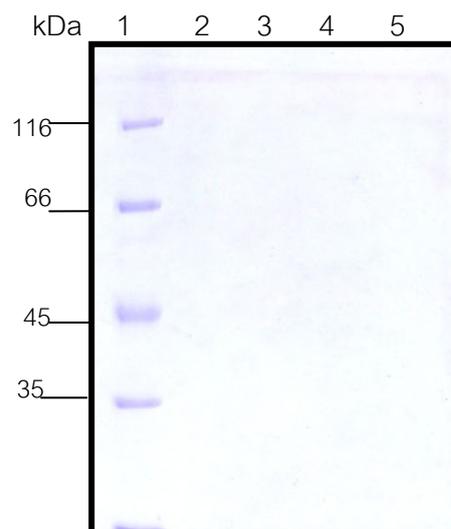
Lane ที่ 5= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 4

Lane ที่ 6= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 2 วันที่ 1

Lane ที่ 7= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 2 วันที่ 2

Lane ที่ 8= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 2 วันที่ 3

Lane ที่ 9= โปรตีนตั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 2 วันที่ 4



(ข) รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ที่ไม่ได้บรรจุพลาสมิด pPICZ α -rphyA170

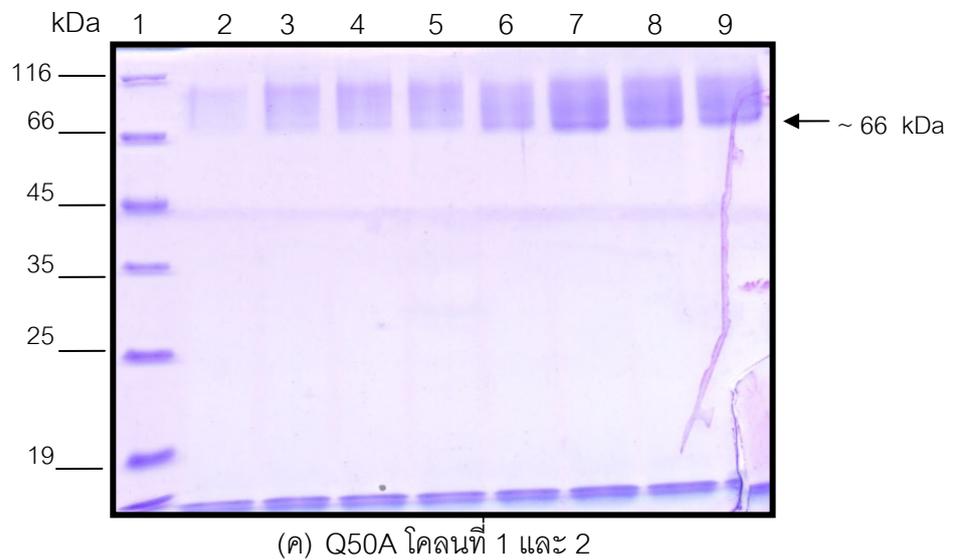
Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนตั้งเดิมจากยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนตั้งเดิมจากยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนตั้งเดิมจากยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 3

Lane ที่ 5= โปรตีนตั้งเดิมจากยีสต์ *P. pastoris* โคลนที่ 1 วันที่ 4



Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 3

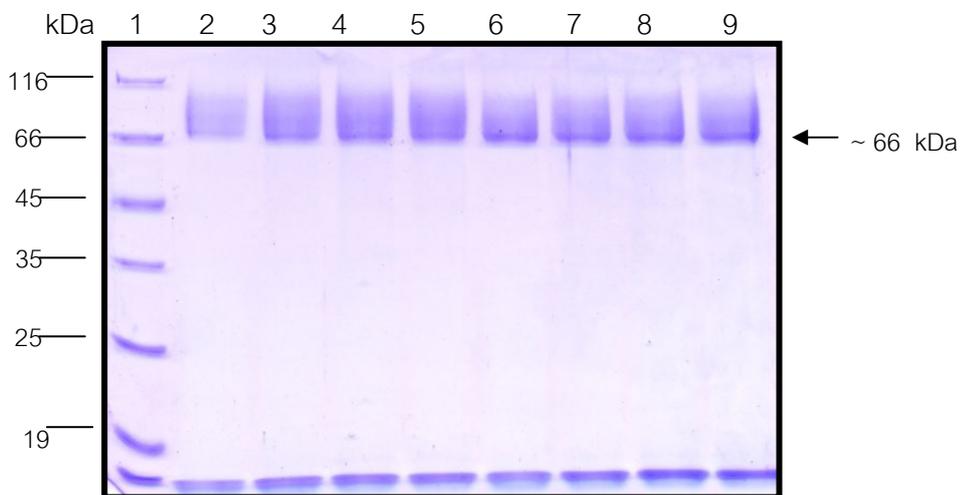
Lane ที่ 5= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 4

Lane ที่ 6= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 1

Lane ที่ 7= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 2

Lane ที่ 8= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 3

Lane ที่ 9= โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 4



(ง) Q50G โคลนที่ 1 และ 3

Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 3

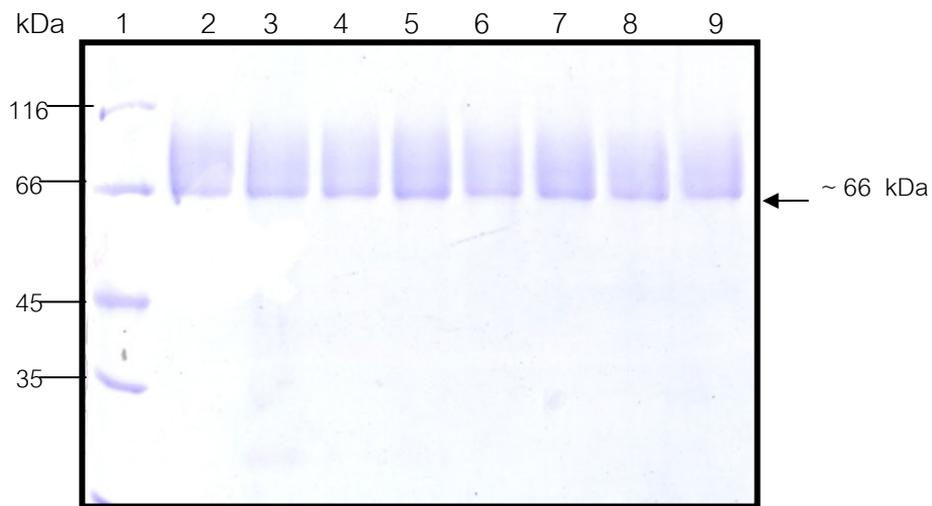
Lane ที่ 5= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 4

Lane ที่ 6= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 1

Lane ที่ 7= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 2

Lane ที่ 8= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 3

Lane ที่ 9= โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 4



(จ) Q50P โคลนที่ 1 และ Q50V โคลนที่ 3

Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนกลาย Q50P จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนกลาย Q50P จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนกลาย Q50P จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 3

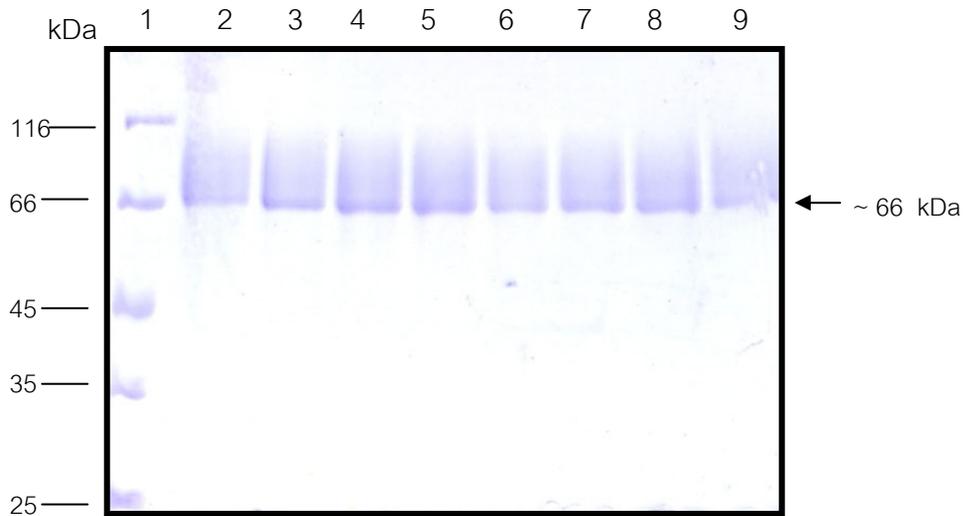
Lane ที่ 5= โปรตีนกลาย Q50V จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 4

Lane ที่ 6= โปรตีนกลาย Q50V จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 1

Lane ที่ 7= โปรตีนกลาย Q50V จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 2

Lane ที่ 8= โปรตีนกลาย Q50V จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 3

Lane ที่ 9= โปรตีนกลาย Q50V จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 3 วันที่ 4



(จ) Q50S โคลนที่ 1 และ 2

Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 3

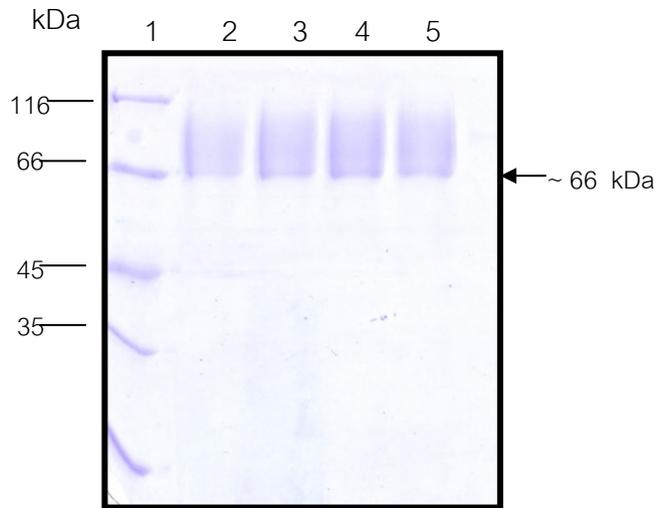
Lane ที่ 5= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 4

Lane ที่ 6= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 1

Lane ที่ 7= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 2

Lane ที่ 8= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 3

Lane ที่ 9= โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 2 วันที่ 4



(ซ) Q50T โคลนที่ 1 และ 2

Lane ที่ 1 = Protein marker

Lane ที่ 2= โปรตีนกลาย Q50T จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 1

Lane ที่ 3= โปรตีนกลาย Q50T จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 2

Lane ที่ 4= โปรตีนกลาย Q50T จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 3

Lane ที่ 5= โปรตีนกลาย Q50T จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*
โคลนที่ 1 วันที่ 4

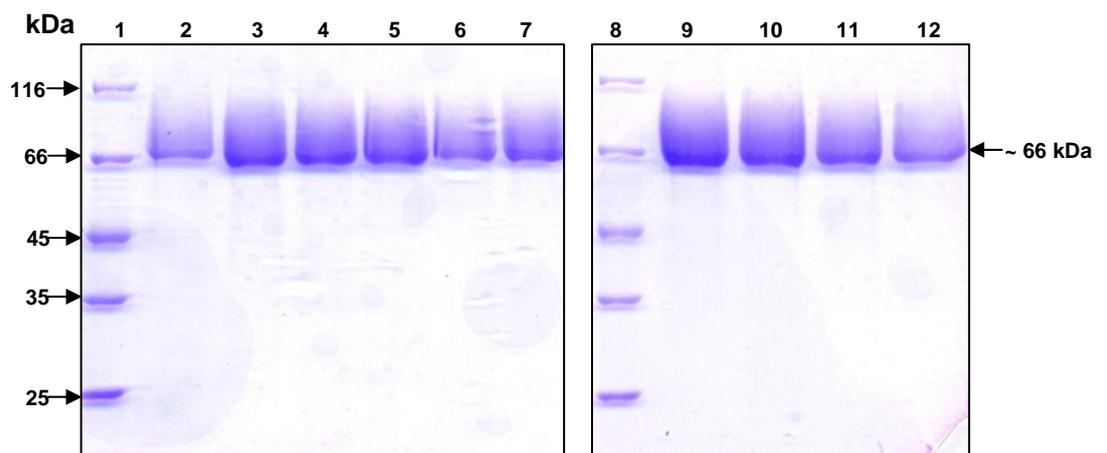
4.8. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ด้วยยีสต์ *P. pastoris*

หลังจากการนำโคโลนีเดียวของยีสต์ *P. pastoris* ที่ได้รับบรรพลาสมิดสายผสมกลาย (pPICZαA-mphyA170) และพลาสมิดสายผสมดั้งเดิม (pPICZαA-rphyA170) ที่สามารถผลิตโปรตีนได้ดีจากระดับขวดทดลองขนาดเล็ก มาเพาะเลี้ยงในระดับขวดทดลอง large scale ผลการวิเคราะห์ด้วย 10% SDS-PAGE ภาพที่ 4.15 พบว่าโคโลนีเดียวของ ยีสต์ *P. pastoris* ที่บรรจุพลาสมิดสายผสมกลาย (pPICZαA-mphyA170) ทั้ง 9 ชนิด สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน phyA170 กลาย ซึ่งมีขนาดประมาณ 66 kDa ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน

phyA170 ดั้งเดิม ที่ผลิตได้จากโคโลนีเดี่ยวของ ยีสต์ *P. pastoris* ที่บรรจุพลาสมิดสายผสม ดั้งเดิม (pPICZαA-rphyA170) เช่นเดียวกับการผลิตโปรตีนในระดับขวดทดลองขนาดเล็ก แต่ได้ โปรตีนที่ผลิตได้มีปริมาณมากขึ้น ดังนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V ซึ่งคาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytases ไปทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ดั้งเดิม ในขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 4.15

ผลการวิเคราะห์ 10% SDS-PAGE ของการแสดงออกของโปรตีน PhyA170 ดั้งเดิมและ โปรตีน PhyA170 กลาย จากรีคอมบิแนนท์เซลล์ *P. pastoris* โดยลูกศรแสดงแถบโปรตีนขนาด 66 kDa



Lane ที่ 1 และ 8 = Protein marker

Lane ที่ 2 = โปรตีนดั้งเดิมจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 3 = โปรตีนกลาย Q50A จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 4 = โปรตีนกลาย Q50G จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 5 = โปรตีนกลาย Q50I จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 6 = โปรตีนกลาย Q50L จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 7 = โปรตีนกลาย Q50N จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 9 = โปรตีนกลาย Q50P จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 10 = โปรตีนกลาย Q50S จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 11 = โปรตีนกลาย Q50T จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

Lane ที่ 12 = โปรตีนกลาย Q50V จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

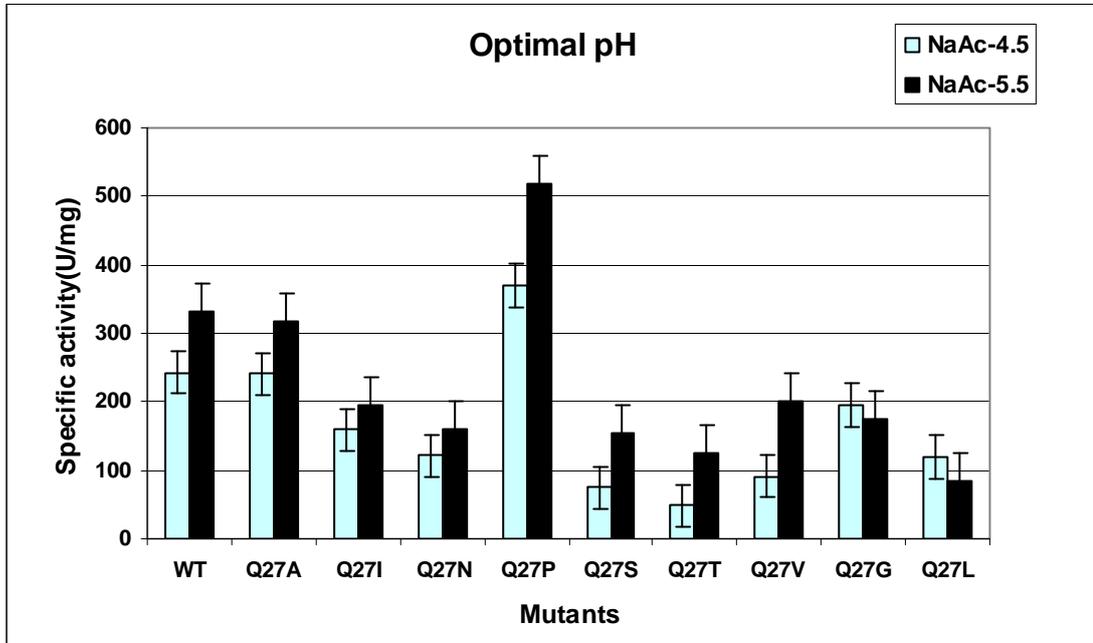
4.9. การทดสอบหาค่า pH และ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ phytases

เพื่อทดสอบว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 ของโปรตีน PhyA170 มีความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytases หรือไม่ จึงได้ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytases โดยใช้สารละลายตัวอย่างรีคอมบิแนนท์ PhyA170 กลาย จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V โดยเปรียบเทียบกับ รีคอมบิแนนท์ phyA170 ดั้งเดิม

ซึ่งผลจากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytases เพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytase เมื่อทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเอนไซม์ phytase ในแต่ละระดับ pH (2-10) ของแต่ละชนิดการกลายพบว่าโปรตีนกลาย Q50A Q50I Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase ที่ 5.5 ซึ่งเป็นค่าเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม ในขณะที่โปรตีนกลาย Q50G และ Q50L จะมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase ที่ 4.5 ดังภาพที่ 4.16 โดยเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ณ สภาวะ pH 5.5 จะพบว่าโปรตีนกลาย Q50P มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า

ภาพที่ 4.16

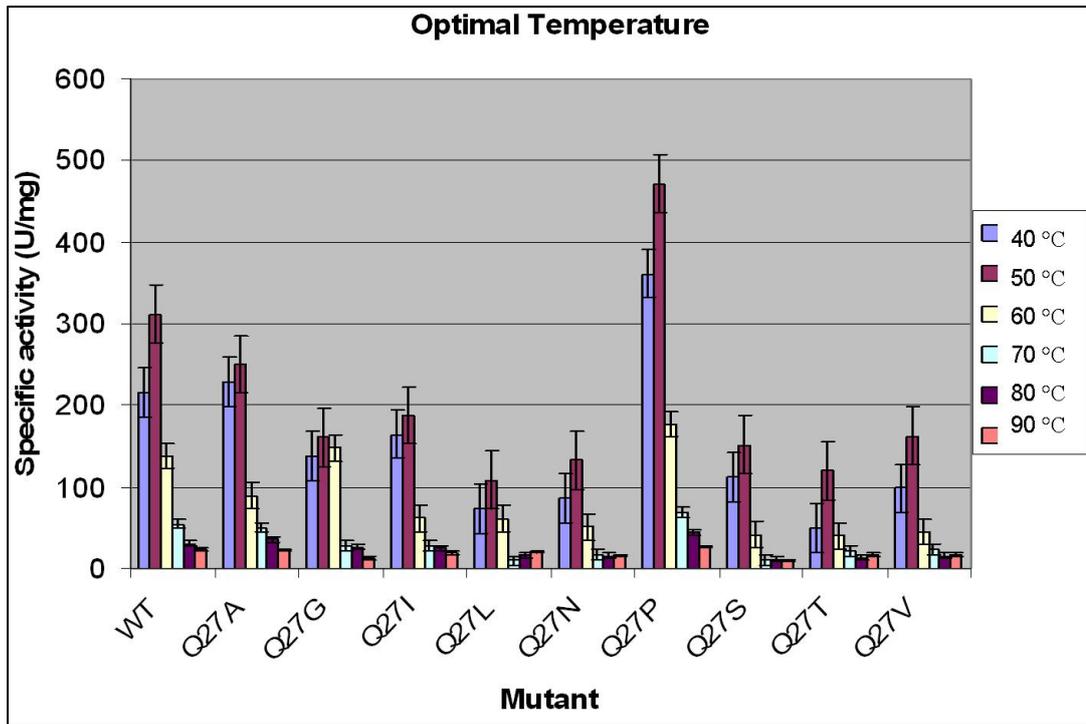
ผลกราฟแสดงค่า กิจกรรมของเอนไซม์ ของเอนไซม์ phytase ที่ค่า pH 4.5 และ 5.5



จากนั้นเมื่อทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytases เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases พบว่าผลของการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายตัวอย่างรีคอมบิแนนท์ PhyA170 กลาย จำนวน 9 ชนิด กับสารละลายสับสเตรต 0.5เปอร์เซ็นต์ phytic acid ใน สารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่สภาวะ pH ที่เหมาะสมของโปรตีนกลายแต่ละชนิด โดยโปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V คือ 5.5 และ คือ 4.5 ที่อุณหภูมิ 40 50 60 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย stop/color reagent เมื่อคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase พบว่าโปรตีนกลายทั้ง 9 ชนิดมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytases อยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 4.17 เช่นเดียวกับโปรตีนดั้งเดิมโดยพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของการทำปฏิกิริยาที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ของโปรตีนกลาย Q50P มีค่าสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า

ภาพที่ 4.17

ผลกราฟแสดงค่า กิจกรรมของเอนไซม์ ของเอนไซม์ phytase
ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 90 องศาเซลเซียส



4.10. การทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสและความร้อนของเอนไซม์ phytase

ผลจากการทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบส ของเอนไซม์ phytases ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 และปมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเอนไซม์ phytase ในแต่ละระดับ pH ของโปรตีนกลายแต่ละชนิดและหาค่า relative activity โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase ที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุด มีค่า relative activity คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในช่วง pH 2-10 โปรตีนกลาย Q50N Q50S Q50T มีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L และ Q50V มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรตีนดั้งเดิมมีค่า relative activity มากกว่า 60

เปอร์เซ็นต์ ในช่วง pH 2 ถึง 9 และโปรตีนกลาย Q50P มีค่า relative activity มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง pH 3 ถึง 10 ผลทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2

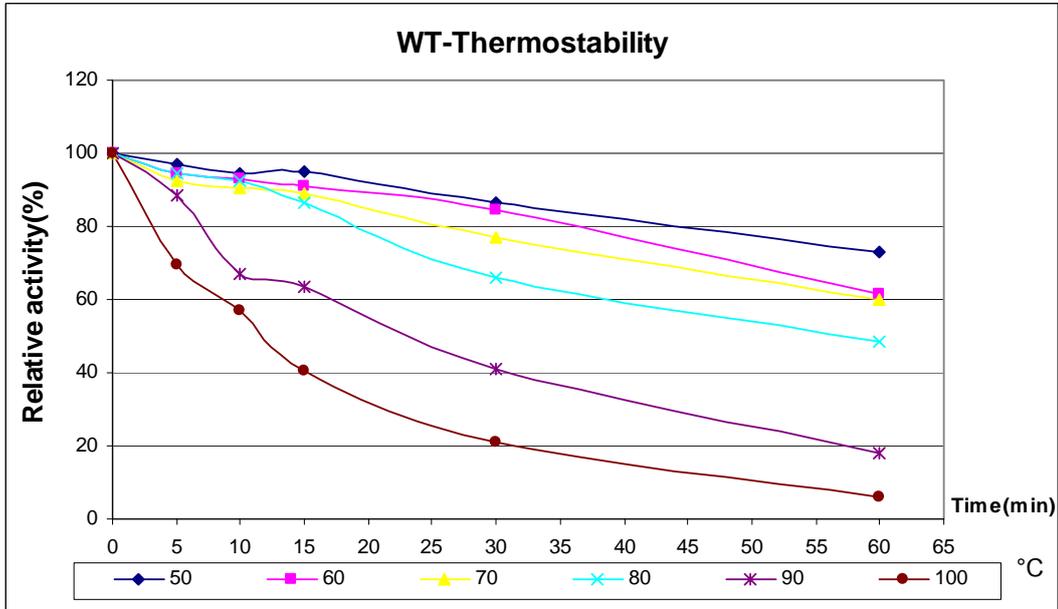
ค่า relative activity ของโปรตีนดั้งเดิม และโปรตีนกลาย ในช่วง pH 2 ถึง 10

ชนิดโปรตีนกลาย	Relative activity
Q50A Q50G Q50I Q50L Q50V	pH 2-10 >50% activity
Q50N Q50S Q50T	pH 2-10 >60% activity
WT	pH 2-9 >60% activity pH 10 >50% activity
Q50P	pH 2 >60% activity pH 3-10 >70% activity

และผลจากการทดสอบความทนต่อความร้อนของเอนไซม์ phytases ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 10 15 30 และ 60 นาที โดยทำการ คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเอนไซม์ phytase และหาค่า relative activity โดย กำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase ที่มีค่ากิจกรรมสูงสุด มีค่า relative activity คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรตีนดั้งเดิมมีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดังภาพที่ 4.18 แต่โปรตีนกลาย Q50I และ Q50L มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังภาพที่ 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ และโปรตีนกลาย Q50P มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังภาพที่ 4.21

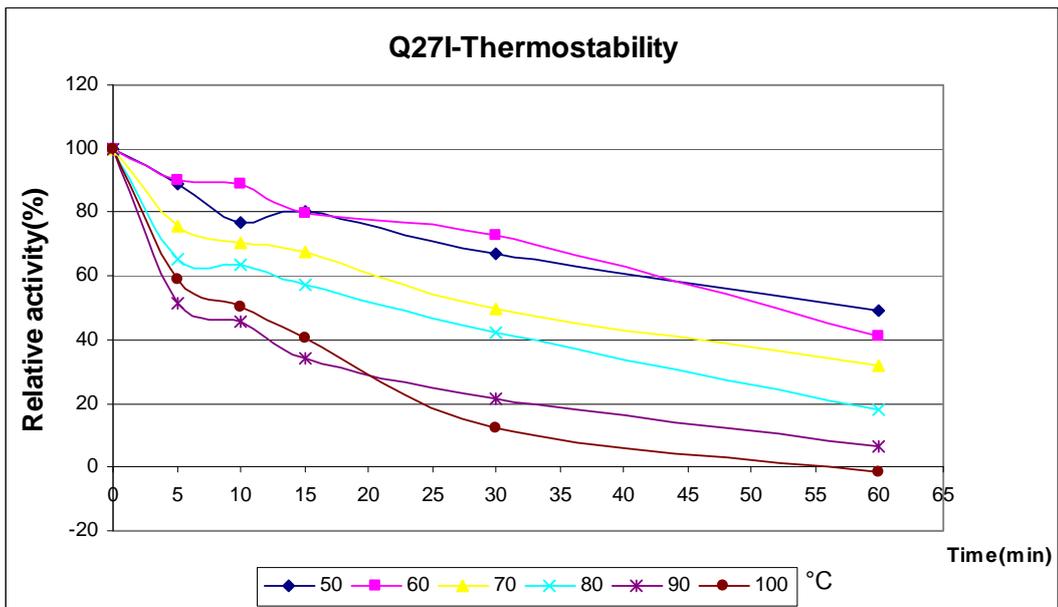
ภาพที่ 4.18

ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase (WT)



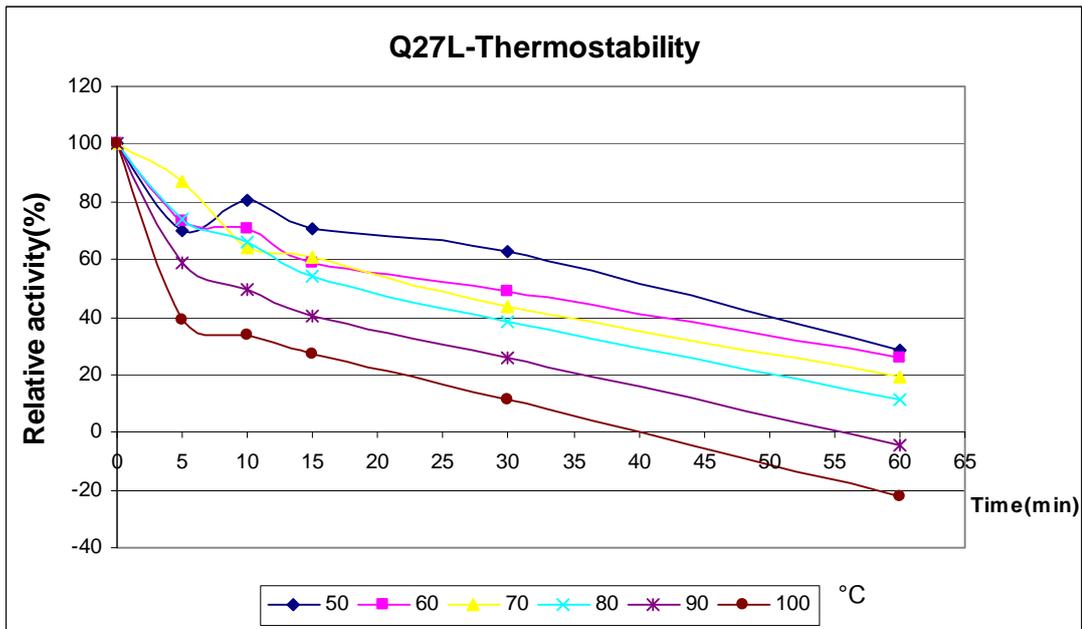
ภาพที่ 4.19

ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase (Q50I)



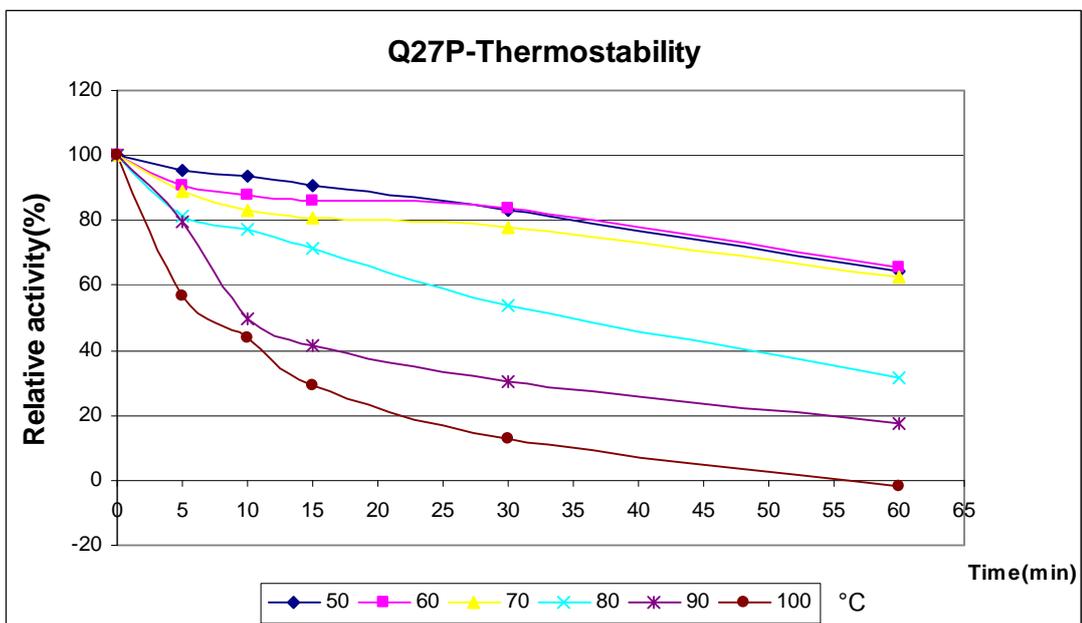
ภาพที่ 4.20

ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase (Q50L)



ภาพที่ 4.21

ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase (Q50P)

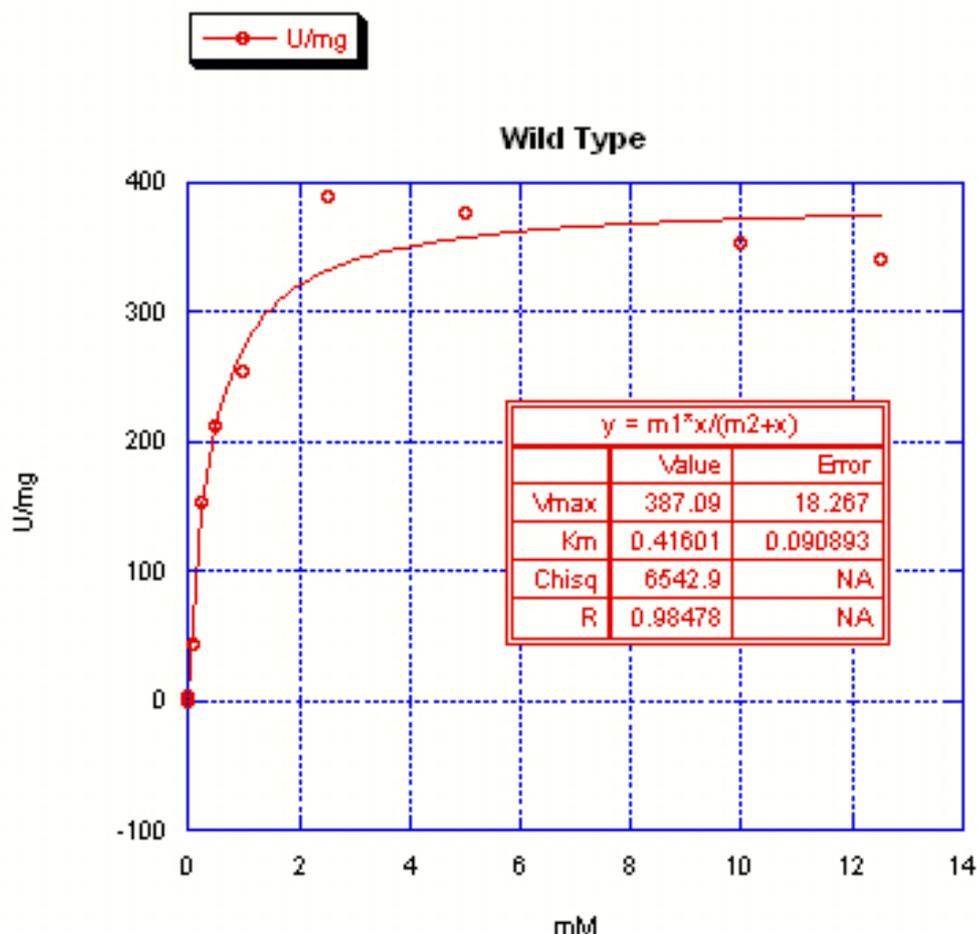


4.11. การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytase

ผลการศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases จะทำโดยทำการทดสอบกิจกรรมของสารละลายตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ sodium acetate pH 5.5 ที่คาดว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กับสารละลายสับสเตรต phytic acid ที่ความเข้มข้น 0.0001 uM – 12.5 mM เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases จะคำนวณโดยใช้หลักการของสมการ Michaelis-Menten ซึ่งจะใช้โปรแกรม KALEIDA-GRAPH version 3.51 (Synergy) พบว่าโปรตีนดั้งเดิมมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.4160 mM และ 387.09 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.22 ส่วน โปรตีนกลาย (Q50L) มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.758 mM และ 109.47 U/mg ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.23 และโปรตีนกลาย (Q50P) มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.731 mM และ 513.81 U/mg ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.24

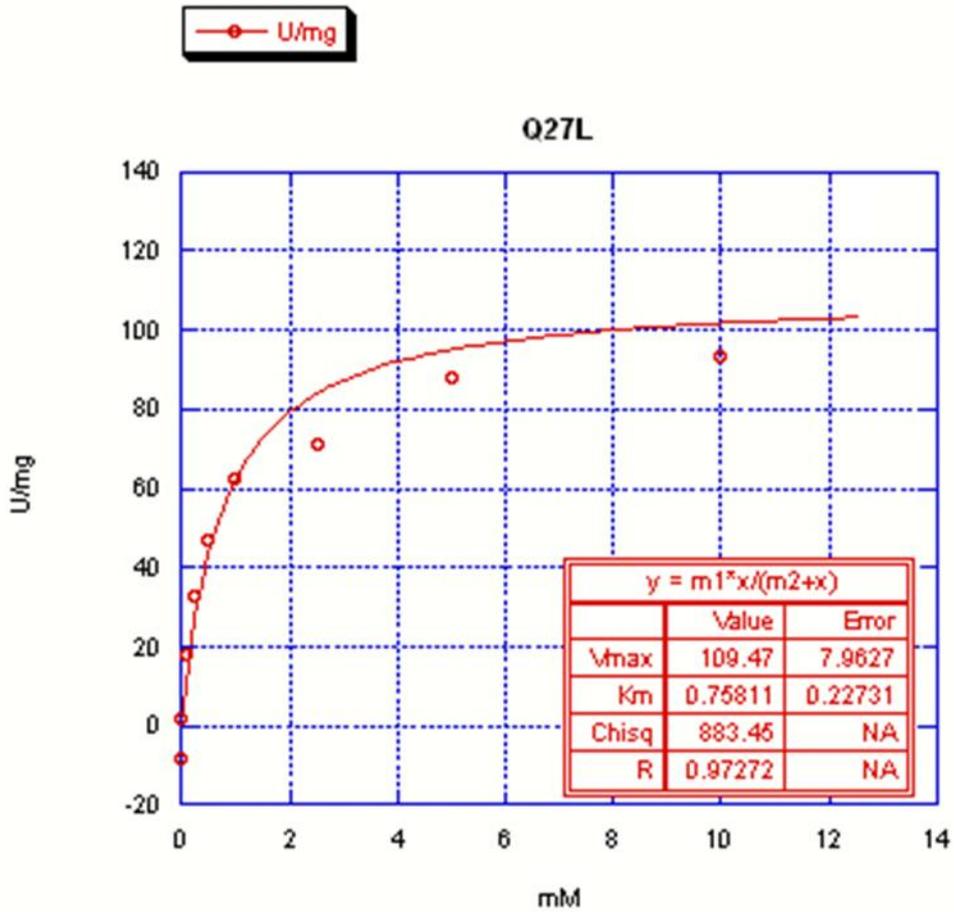
ภาพที่ 4.22

ผลกราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ K_m และ V_{max} ของโปรตีนดั้งเดิม



ภาพที่ 4.23

ผลกราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ K_m และ V_{max} ของโปรตีนกลาย (Q50L)



ภาพที่ 4.24

ผลกราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ K_m และ V_{max} ของโปรตีนกลาย (Q50P)

