ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การแสดงออกและสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสจากเซลล์ลูกผสมสายพันธุ์ *Escherichia* และสายพันธุ์ *Pichia*

Expression and Characterization of Keratinase from Recombinant *Escherichia* and *Pichia* Strains

นามผู้วิจัย นายเจนวิชญ์ พฤฑฒิกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกและสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสจากเซลล์ลูกผสมสายพันธุ์ *Escherichia* และสายพันธุ์ *Pichia*

Expression and Characterization of Keratinase from Recombinant *Escherichia* and *Pichia* Strains

โดย

นายเจนวิชญ์ พฤฑฒิกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจนวิชญ์ พฤฑฒิกุล 2555: การแสดงออกและสมบัติของเอนไซม์เคราติเนส จากเซลล์ลูกผสมสายพันธุ์ *Escherichia* และสายพันธุ์ *Pichia* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 108 หน้า

Bacillus licheniformis KUB-K0006 เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เคราติเนสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ได้สูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตขนไก่ป่นเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 มีการสร้างเมือกในระหว่างการเจริญทำให้ผลผลิตเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงศึกษาการโคลนและแสดงออกของยีนเคราติเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 ในเซลล์เจ้าบ้านอื่น เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิตและหลั่งเอนไซม์เคราติเนสออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ในระดับสูง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนเคราติเนสและเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวคเตอร์สำหรับการแสดงออก คือ pFLAG-CTS และ pPICZα B ถ่ายโอนเข้าสู่ *Escherichia coli* Rosetta และ TOP10 และ *Pichia pastoris* Y11430 ตามลำดับ พบว่ายีนเคราติเนสสามารถแสดงออกในระบบ *E. coli* และ *P. pastoris* ได้ ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์เคราติเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบรีคอมบิแนนท์เคราติเนสขนาด 54 กิโลดาลตัน แต่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้ ในขณะที่เซลล์ลูกผสม *P. pastoris* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เคราติเนสที่มีขนาด 47 กิโลดาลตัน รีคอมบิแนนท์เคราติเนสที่ผลิตสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ และแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 10.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสจากการใช้ขนไก่บดเป็นสับสเทรต

_____ / ____ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Janwit Phuttikul 2012: Expression and Characterization of Keratinase from Recombinant *Escherichia* and *Pichia* Strains. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 108 pages.

Bacillus licheniformis KUB-K0006 is an effective source of keratinase. This enzyme can be used in feather meal preparation as protein source in feed. However, the yield of enzyme production was decreased because the large amount of mucus was produced during bacterial growth. Cloning and expression of keratinase gene from *B. licheniformis* KUB-K0006 were done to construct the recombinant strains that could produce and secrete high level of keratinolytic enzyme. To express the keratinase gene, the primer pairs were designed to amplify the gene fragment. The keratinase gene was ligated into pFLAG-CTS and pPICZα B expression vector and transformed into *Escherichia coli* Rosetta and TOP10 and *Pichia pastoris* Y11430, respectively. Keratinase was successfully expressed in the *E. coli* and *P. pastoris* expression system. The recombinant keratinase from recombinant *E. coli*, using SDS-PAGE, was 54 kDa protein. However, protease and keratinase activity were not detected. The recombinant *P. pastoris* could express 47 kDa protein in the culture medium. The protease activity of 10.46 u/ml was observed but keratinase activity using feather meal as substrate was not detected.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบ ขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริ ฐ ประธานการสอบและ ผศ. ดร. นฤมล ธนานันต์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอ บพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่า น ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ และเจ้าหน้า ที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่า น ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ และขอขอบคุณนางสาว สุวัฒนา วิเศษนั นท์ ที่เป็นกำลังใจให้เสมอมา และขอขอบคุณกัลยาณมิตรทุกท่าน

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2552

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

เจนวิชญ์ พฤฑฒิกุล

มีนาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	76
สรุป	76
ข้อเสนอแนะ	77
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	78
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	90
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์	93
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ข้อมูลดิบจากการทดลอง	101
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	108

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของขนไก่ดิบ	5
2	แหล่งของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนส	9
3	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	26
4	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	68
5	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	69

ตารางผนวกที่

ค1	มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีเอสดีเอส-เพจ	102
ค2	มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* TOP10 (pFKER) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีเอสดีเอส-เพจ	103
ค3	มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ	104
ค4	มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ	105

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างไฮโดรเจนบอน (A) และไดซัลไฟด์บริด (B) ของเคราติน	6
2	โครงสร้างของเคราติน	6
3	กลไกการทำงานของ serine protease	11
4	พลาสมิด pFLAG-CTS	18
5	พลาสมิด pPICZα B	20
6	ดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีนเคราติเนสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์	41
7	ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER	41
8	ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pGKER ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER	43
9	ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pGKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II	43
10	ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pGKER	44
11	การตัดพลาสมิดลูกผสม pGKER และการตัดพลาสมิด pFLAG-CTS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II	45
12	การเชื่อมต่อระหว่างยีนเคราติเนสกับพลาสมิด pFLAG-CTS ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II	46
13	ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER ที่ใช้พลาสมิดลูกผสม pFKER เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ	47
14	การตัดพลาสมิดลูกผสม pFKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II	47
15	ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pFKER	48
16	การตรวจสอบยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pFKER จากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER	49
17	การตัดพลาสมิดลูกผสม pFKER จากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	การตรวจสอบโปรตีนในส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตกและในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก จากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER) ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG	52
19	การตรวจสอบโปรตีนในส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตกและในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก จากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* TOP10 (pFKER) ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG	53
20	ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1	55
21	ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pTKER ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1	57
22	ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pTKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I	57
23	ลำดับเบสของยีนเคราติเนสเมื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTKER	58
24	การตัดพลาสมิดลูกผสม pTKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I	60
25	การตัดพลาสมิด pPICZα B ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I	60
26	การเชื่อมต่อระหว่างยีนเคราติเนสกับพลาสมิด pPICZα B ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I	61
27	ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1 ที่ใช้พลาสมิดลูกผสม pPKER เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ	61
28	การตัดพลาสมิดลูกผสม pPKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I	62
29	ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pPKER	63
30	โครโมโซมของเซลล์ยีสต์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 2 โคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก YPD agar ที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	64
31	การตรวจสอบยีนเคราติเนสบนโครโมโซมของเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1	65

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	การตรวจสอบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเซลล์ (crude enzyme) จาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1) เปรียบเทียบกับ *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ	70
33	การตรวจสอบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเซลล์ (crude enzyme) จาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2) เปรียบเทียบกับ *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ	71
34	การตรวจสอบความสามารถในการย่อยขนไก่ของเซลล์ยีสต์ลูกผสมหลังจากย่อยเป็นเวลา 14 วัน	72

ภาพผนวกที่

ค1	แสดงค่า Rf กับ ค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER)	106
ค2	แสดงค่า Rf กับ ค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* TOP10 (pFKER)	106
ค3	แสดงค่า Rf กับ ค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1)	107
ค4	แสดงค่า Rf กับ ค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2)	107

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแสดงออกและสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสจากเซลล์ลูกผสมสายพันธุ์ *Escherichia* และสายพันธุ์ *Pichia*

Expression and Characterization of Keratinase from Recombinant *Escherichia* and *Pichia* Strains

คำนำ

อุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อภายในประเทศไทย มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดของเสียจำนวนมากโดยเฉพาะขนไก่ซึ่งสลายตัวได้ช้าในสภาพธรรมชาติ จากข้อมูลสำนักงานเศรฐกิจการเกษตรรายงานว่าในปี 2553 มีการผลิตไก่เนื้อในประเทศไทยทั้งสิ้น 970,943,058 ตัว และทำให้เกิดของเสียเป็นขนไก่ประมาณ 48,547,153-67,966,014 กิโลกรัม จึงจำเป็นต้องมีวิธีจัดการขนไก่อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม วิ ธีการนำขนไก่กลับมาใช้ประโยชน์ใหม่โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม แต่เนื่องจากขนไก่มีองค์ประกอบหลักเป็นโปรตีนเคราตินจัดเป็นโปรตีนเส้นใยมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและไม่สามารถย่อยสลายได้โดยน้ำย่อยโปรตีนภายในร่างกายสัตว์ ดังนั้นจึงต้องทำลายโ ครงสร้างของขนไก่ที่เป็นอุปสรรคต่อเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เสียก่อน เพื่อให้สัตว์สามารถนำกรดอะมิโนในขนไก่ไปใช้ประโยชน์ได้มากที่สุด จึงมีการแปรรูปขนไก่ให้อยู่ในรูปขนไก่ป่น (feather meal) ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น วิธีการทางกายภาพ โดยนำขนไก่ไปอบด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน (Baker *et al.*, 1981) แต่พบว่าการนำไปใช้ได้ของสัตว์อยู่ในระดับต่ำ วิธีทางเคมี โดยการนำสารเคมีมาใช้ในการย่อยขนไก่ แต่มีข้อเสียคือสารเคมีราคาแพงและยากต่อการควบคุมในกระบวนการผลิต ในปัจจุบันวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์เคราติเนส (keratinase) มาย่อยข นไก่เพื่อให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากขนไก่เป็นที่มีความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถควบคุมการผลิตได้ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยต่อตัวสัตว์

ในประเทศไทย ได้มีการทดลอง แยกเชื้อจุลินทรีย์ ที่ผลิตเอนไซม์เคราติเนส ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2540 โดยพบเชื้อ จุลินทรีย์ที่สามารถ ผลิตเอนไซม์เคราติเนส และแสดง ย่อยสลายขนไก่ได้ดี 2 สายพันธุ์ คือ *B. licheniformis* KUB-K0006 และ *B. pumilus* KUB-K0082 โดย *B. licheniformis* KUB-K0006 มีแนวโน้มในการนำไปใช้ในการเตรียมขนไก่ป่นได้ดี (สุทธิพันธุ์, 2540) แต่เนื่องจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 มีการสร้างเมือกในระหว่างการเจริญส่งผล ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้ลดลงและเป็นปัญหาในการทำเอน ไซม์ให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึง ศึกษาการ โคลนยีนแสดงเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 โดยใช้พลาสมิด pUB110 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบเซลล์ลูกผสมที่แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนส แต่ไม่สามารถตรวจสอบหายีนเคราติเนสจากพลาสมิดลูกผสมได้ (กฤษณี, 2545) และในช่วงเวลาใกล้เคียงกันมี การศึกษาการโคลนยีนเคราติเนสจากเชื้อ *B. pumilus* KUB-K0082 เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 และ *E. coli* DH5α โดยใช้พลาสมิด pUB110 และ pUC19 เป็นดีเอ็นเอพาหะตามลำดับ พบว่าเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 ชนิด แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนสได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบหายีนเคราติเนสจากพลาสมิดลูกผสมทั้ง 2 ชนิดได้ (ณัฐวดี, 2546) ต่อมาได้มีการศึกษาการโคลนยีนแสดงเอน ไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้าสู่ *E. coli* DH5α และ *B. subtilis* 1A751 โดยใช้พลาสมิด pHT43 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบว่าเซลล์ลูกผสม *E. coli* DH5α แสดงความไม่เสถียรในการผลิตเอนไซม์ โดยในการแสดงออกของยีนในครั้งแรกสามารถแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคร าติเนสได้ แต่ไม่สามารถแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติ เนสในการแสดงออกของยีนในครั้ง ต่อไปได้และไม่สามารถตรวจสอบหายีนเคราติเนสจากพลาสมิดลูกผสมได้ ในขณะที่เซลล์ลูกผสม *B. subtilis* 1A751 สามารถตรวจสอบหายีนเคราติเนสจากพลาสมิดลูกผสมได้ แต่เซลล์ลูกผสมไม่สามารถแสดงกิจ กรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้ (ขวัญคณิศร์, 2551) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยใช้ระบบการแสดงออกในเชื้อ *E. coli* Rosetta และ TOP10 และใน *P. pastoris* Y11430 ซึ่งระบบการแสดงออกที่ใช้ เป็นระบบที่ สามารถสร้างเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ เพื่อให้ได้ระบบการแสดงออก ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 โดยใช้ระบบการแสดงออกใน *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris*

2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสที่แสดงออกจากระบบการแสดงออกใน *Escherichia coli* และ *Pichia pastoris*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของขนไก่

โปรตีนเคราตินเป็นองค์ประกอบหลักใน ผม ขน เล็บ เขาสัตว์ และในขนของสัตว์ปีกชนิดต่างๆ เช่น ขนนก ขนเป็ด และขนไก่ ซึ่งเคราตินจัดเป็นโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างซิสเทอีน (cysteine) ดังแสดงในภาพที่ 1 ทำให้เคราตินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ยาก (Papadopoulos *et al*., 1986) ดังนั้นชิ้นส่วนต่างๆของสัตว์ที่กล่าวมานี้ไม่สามารถละลายน้ำได้ ในขนไก่ประกอบด้วยโปรตีนแอลฟาเคราติน (α-keratin) สูงถึง 85-90 เปอร์เซ็นต์ (Harrwap and Wood, 1964) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยไขมัน แคลเซียม และฟอสฟอรัสในปริมาณที่ต่ำแ สดงดังตารางที่ 1 โปรตีนแอลฟาเคราตินที่เป็นองค์ประกอบหลักของขนไก่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์เช่นเดียวกับโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยภายในโครงสร้างของเคราตินจะมีลักษณะเป็นสายเปปไทด์สองสายจับกันหมุนเป็นเกลียวเวียนขวายึดกันไว้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) แล้วเปปไทด์เกลียวคู่สองสายจะจับกันเป็นเกลียวเวียนซ้ายเรียกว่า ซุปเปอร์เฮลิค (superhelix) และไดเมอร์ของซุปเปอร์เฮลิคจะมาจับกันเป็นเตตระเมอร์กลายเป็นโปรโตฟิลาเมนต์ (protofilament) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 นาโนเมตร และท้ายสุดโปรโตฟิลาเมนต์ 8 สาย จะมารวมตัวกันเป็น intermediate filament ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นาโนเมตร (Koolman and Roehm, 2005) ดังแสดงในภาพที่ 2

1.1 การปรับปรุงขนไก่เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์

การนำขนไก่มาใ ช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์เพื่อทดแทนการนำเข้าวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์ อาทิ เนื้อสัตว์หรือส่วนอื่ น ๆของสัตว์ กากวัตถุดิบ และพรีมิกซ์เป็นต้น ซึ่งในแต่ละปีต้องนำเข้าเป็นจำ นวนมากคิดเป็นมูลค่าประมาณ 43,209,355,170 บาทต่อปี (กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูน ย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ , 2552) ในการนำขนไก่มาใช้นั้นต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของขนไก่ให้สัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ วิธีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของขนไก่นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

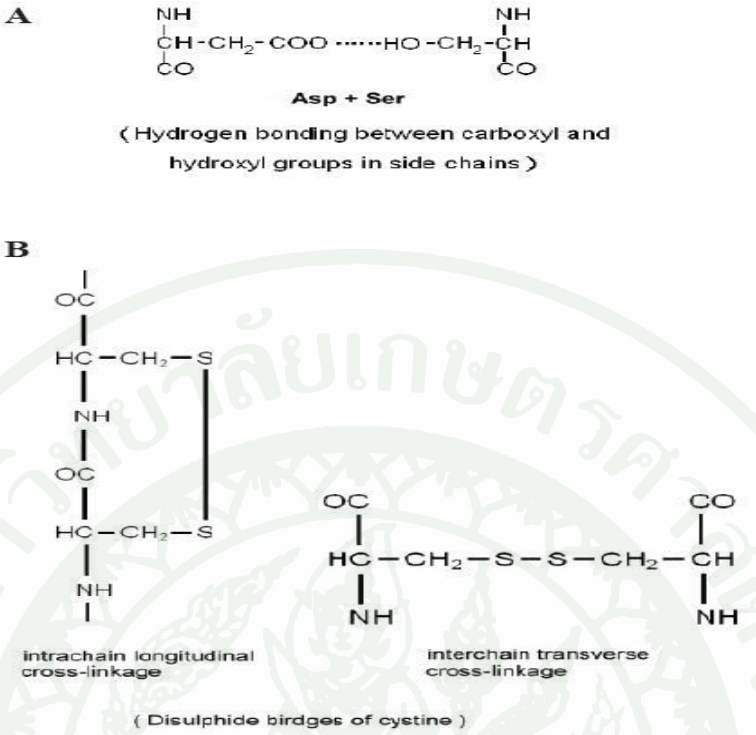
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของขนไก่ดิบ

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	3.26
โปรตีน	86.43
ไขมัน	2.96
เถ้า	4.06
แคลเซียม	0.28
ฟอสฟอรัส	0.76
อาร์จินีน	7.08
ไลซีน	2.22
เมทไธโอนีน	0.83
ซิสตีน	9.02
ทริปโตเฟน	0.86
ฮิสทีดีน	0.80
ลูซีน	8.40
เฟนนิลอะลานีน	4.91
ไทโรซีน	3.11
เวลีน	7.97
กลูตามิคแอซิด	12.11
ไอโซลูซีน	5.25
ไกลซีน	7.92
ทรีโอนีน	5.21

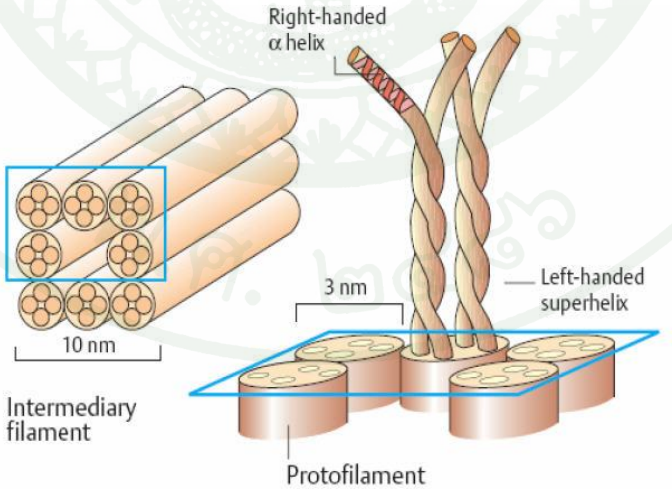
ที่มา: เยาวมาลย์ และ สาโรจน์ (2521)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 โครงสร้างไฮโดรเจนบอน (A) และไดซัลไฟด์บริด (B) ของเคราติน

ที่มา: Lehninger (1993)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเคราติน

ที่มา: Koolman and Roehm (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.1 การใช้ความร้อนและความดันสูงประมาณ 130-150 องศาเซลเซียส และความดัน 30-50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 0.5 - 2 .5 ชั่วโมง แล้วบดให้อยู่ในรูปขนไก่ป่น (feather meal) อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองพลังงาน และเสียค่าใช้จ่ายสูงในการติดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ และที่สำคัญการใช้พลังงานสูงทำให้ขนไก่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการบางส่วน อาทิ กรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด Baker *et al* . (1981) พบว่ากรดอะมิโนซิสทีนจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบแลนไทโอนีน (lanthionine) เนื่องจากความร้อนทำให้โมเลกุลของซิสทีนสูญเสียซัลเฟอร์ (sulfur) ทำให้เกิดการลดลงของ sulfur amino acid ที่เป็นประโยชน์

1.1.2 การใช้สารเคมี ที่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซิ่ง เช่น เมอร์แคบโต อะซีเตต (Mercapto acetate) ทองแดง (II) ซัลเฟต [Copper (II) sulphate] โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate) และแอมโมเนีย (ammonia) แต่วิธีนี้ มีข้อเสียคือ สารเคมี ที่ใช้มีราคาสูงและยากต่อการควบคุมการผลิต (Swan, 1961)

1.1.3 การใช้เอนไซม์เคราติเนสซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์โดย Shih and William (1990) พบว่าการใช้เอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* PWD-1 สามารถเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนจาก 30 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีการนี้ สามารถลด ต้นทุนและควบคุมการผลิตได้ง่าย Lee *et al.* (1991) พบว่าเมื่อนำเอนไซม์เคราติเนส ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* PWD-1 มาผสมเข้ากับขนไก่หรือขนไก่ป่นจะช่วยให้สัตว์สามารถนำกรดอะมิโนไปใช้ในการเจริญเติบโตได้มากขึ้น อีกทั้งยังมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) วาลีน (valine) และ ทรีโอนีน (threonine) สูงกว่ากากถั่วเหลืองอีกด้วย นอกจากนี้ก ารแปรรูปขนไก่ป่นโดยใช้ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้ยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับขนไก่ป่นได้ เนื่องจากในกระบวนการหมักจะพบเมทไธโอนีน (methionine) ไลซีน (lysine) และ อาร์จินีน (arginine) ในปริมาณสูง อีกทั้งชีวมวลจากจุลินทรีย์ยังเป็นแหล่งของโปรตีนด้วย (Williams *et al.*, 1991) นอกจากนี้เอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* PWD-1 ยังถูกนำไปผลิตเพื่อจำหน่ายเป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ ภายใต้เครื่องหมายการค้า Versazyme ซึ่งเป็นลิขสิทธิ์ของ BioResource International Inc (BRI) ของสหรัฐอเมริกา (Wang *et al.*, 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. เอนไซม์เคราติเนส

เอนไซม์เคราติเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนอย่างเคราติน ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสจะแตกต่างกันตามแหล่งของเอนไซม์ จากการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เคราติเนสจากหลายๆแหล่ง พบว่าส่วนใหญ่เชื้อจุลินทรีย์จะผลิตและขับเอนไซม์เคราติเนสออกนอกเซลล์ โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางจนถึงด่างและที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส (Gupta and Ramnani, 2006) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราติเนสก็มีหลากหลายเช่นกัน โดยขนาดเล็กสุดคือ18 กิโลดาลตันจาก *Streptomyces albidoflavus* SL1-02 และเอนไซม์เคราติเนสขนาดใหญ่ที่สุดผลิตจาก *Kocuria rosea* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 240 กิโลดาลตัน (Bernal *et al*., 2003)

2.1 แหล่งของเอนไซม์เคราติเนส

เอนไซม์เคราติเนสสามารถผลิตได้จากทั้งแบคทีเรีย และรา (ตารางที่ 2) ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้จะแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของจุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสมักพบในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะกลุ่มของ *Bacillus* นอกจากนั้นพบว่ากลุ่มของ *Lysobacter, Nesternokia*, *Kocuria* และ *Microbacterium* สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้เช่นกัน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสพบได้ในกลุ่ม *Vibrio*, *Xantomonas*, *Fervidobacterium* และ *Chryseobacterium* (Gupta and Ramnani, 2006) แอคติโนมัยซิสที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มข อง *Streptomyces* เช่น *S. fradua*, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. termoviolaccus* SD8 และ *S. graminogaciens* และกลุ่มของ *Thermoactinomyces* เช่น *T. candidus* (Gupta and Ramnani, 2006) ส่วนราที่ผลิตเอนไซม์เคราติเนสมีหลายกลุ่ม เช่น *Chrysosporium*, *Aspergillus, Alternaria, Trichurus*, *Urocladium* และ *Penicillium* เป็นต้น แต่ไม่นิยมใช้เชื้อราในการผลิตเอนไซม์เคราติเนสเนื่องจากส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่ ก่อโรคผิวหนัง (Gradisar *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 แหล่งของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนส

จุลินทรีย์	ที่มา
แบคทีเรีย-แกรมบวก:	
Bacillus licheniformis PWD-1	Williams *et al*., 1990
Bacillus licheniformis RG1	Ramnani and Gupta, 2004
Bacillus licheniformis and *Bacillus subtilis* ATCC 6633	Zerdani *et al*., 2004
Bacillus subtilis S14	Macedo *et al*., 2005
Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis and *Bacillus cereus*	Kim *et al*., 2001
Bacillus psuedofirmus	Gessesse *et al*., 2003
Bacillus macroides and *Bacillus cereus*	Lucas *et al*., 2003
Bacillus licheniformis KUB-K0006 and *Bacillus pumilus* KUB-K0082	Keawsompong, 1997
Bacillus pumilus, *Bacillus cereus* and *Bacillus* sp. FK28	Pissuwan and Suntornsuk, 2001
Bacillus pseudofirmis AL-89 and *Nesternokia* sp. AL-20	Gassesse *et al*., 2003
Fervidobacterium pennavorans	Friedrich and Antranikian, 1996
Streptomyces pactum DSM 40530	Böckle *et al*., 1995
Streptomyces albidoflavus K1-02	Bressolier *et al*., 1999
Streptomyces thermoviolaceus	Chitte *et al*., 1999
Streptomyces graminogaciens	Gupta and Ramnani, 2006
Kocuria rosea	Bernal *et al*., 2006a
Microbacterium arborescens Kr10	Thys *et al*., 2004
Microbispora aerate and *Streptomyces flavus*	Gushterova *et al.,* 2005
Terrabacter terrae	Montero-Barrientos *et al*., 2005
Thermoactinomyces keratinolyticum	Hussein and Swelim, 1995

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

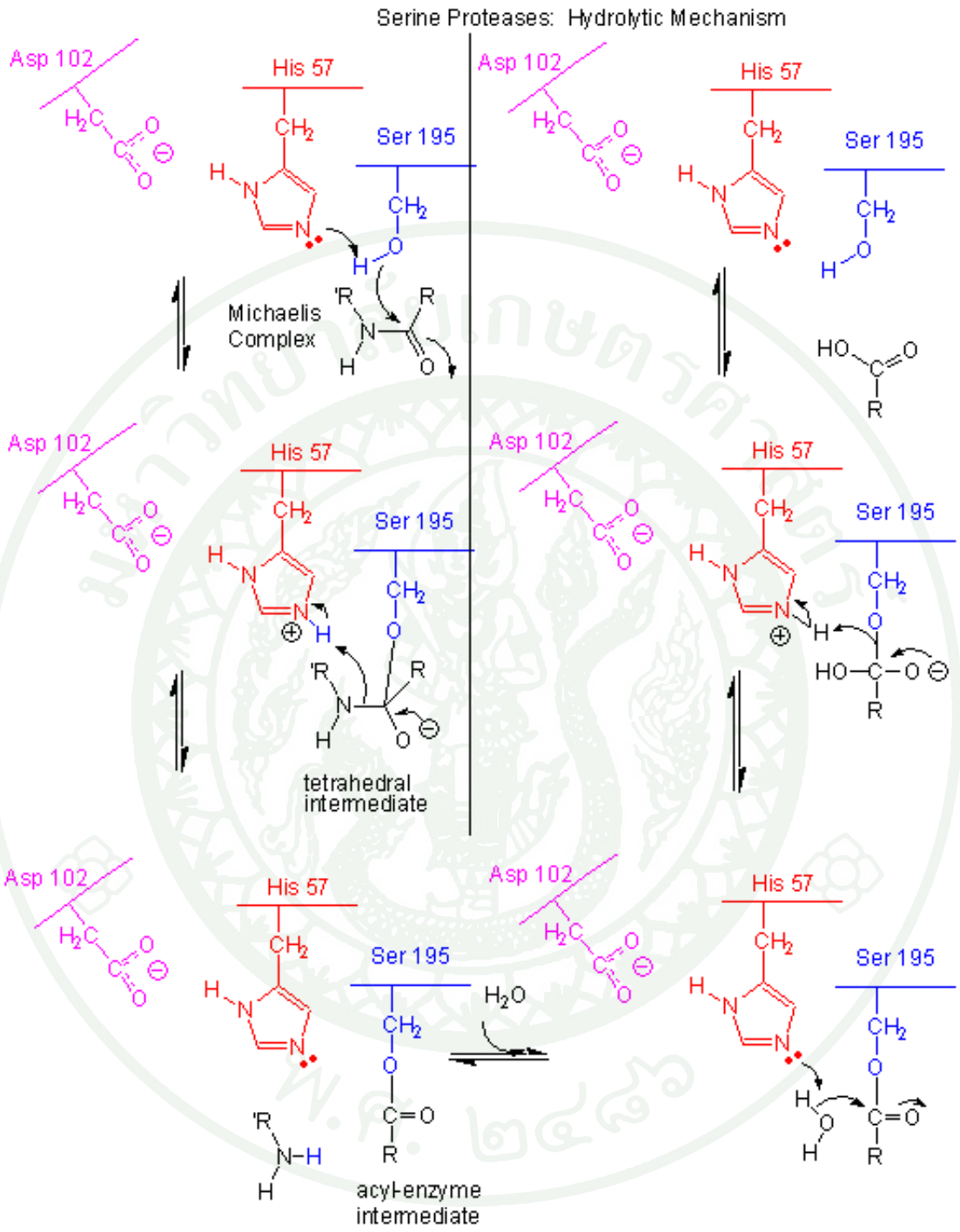
จุลินทรีย์	ที่มา
Thermoactinomyces candidus	Gupta and Ramnani, 2006
Thermoanaerobacter keratinophilus sp.nov.	Rissen and Antranikian, 2001
แบคทีเรีย-แกรมลบ:	
Vibrio sp. kr2	Sangali and Brandelli 2000b
Lysobacter sp. NCIMB 9497	Allpress *et al*., 2002
Stenotrophomonas sp.	Yamamura *et al*., 2002
Chryseobacterium sp. kr6	Riffel *et al*., 2003b
Alcaligenes faecalis, Janthinobacterium	
lividum and *Stenotrophomonas maltophilia*	Lucas *et al*., 2003
รา:	
Aspergillus fumigatus	Santo *et al*., 1996
Doratomyces microsporus	Gardisar *et al*., 2000

ที่มา: ดัดแปลงจาก Brandelli *et al*. (2008)

2.2 การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์เคราติเนส

เอนไซม์เคราติเนสที่พบใน *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน กลุ่ม Serine endopeptidases (EC 3.4.21.-) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิที่บริเวณเร่งเป็น Asp-His-Ser (Rawlings *et al*., 2008) โดยซีรีน (serine) ทำหน้าที่เป็น neucleophile แอสพาเตท (aspartate) ทำหน้าที่เป็น electrophile และ ฮิสทิดีน (histidine) ทำหน้าที่เป็นเบส ซึ่งกลไกการทำงานของ serine protease ประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ catalysis โดยเอนไซม์จับกับสับสเตรทที่ตำแหน่งของซีรีนในบริเวณเร่ง ทำให้เกิดประจุลบและอยู่ในสภาวะ tetrahedral transition state ทำให้พันธะเปปไทด์ถูกตัดออกได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอมีน ส่วนที่ยังจับอยู่กับเอนไซม์จะเกิด acyl-enzyme intermediate แล้วเข้าสู่ขั้นตอน deacylation ซึ่ง acyl-enzyme intermediate จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำทำให้พันธะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทถูกทำลาย (Jakubowski, 2008) ดังแสดงในภาพที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของ serine protease

ที่มา: Jakubowski (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 เอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006

B. licheniformis KUB-K0006 ถูกคัดแยกจากฟาร์มไก่ในประเทศไทยเมื่อปี 2540 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อย สลายขนไก่ ได้ดี และจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสพบว่าสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5-7 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีความเสถียรที่พีเอช 6-7 และอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส หลังการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแ บบเอสดีเอส- เพจ พบว่าเอนไซม์จาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (component) เรียกว่า SUK A และ SUK B ตามลำดับ มีมวลโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตัน (สุทธิพันธุ์ , 2540) ภายหลังได้มีการศึกษาเพิ่มเติม ถึงคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ เช่น ค่า pI ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่าเอนไซม์ SUK A และ SUK B มีค่า pI เท่ากับ 8.0 และ 8.45 ตามลำดับ จากค่า pI ที่ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ SUK A และ SUK B เป็นเอนไซม์คนละชนิดกั น และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์บริสุทธิ์ มาทดสอบชนิดของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าเอนไซม์ SUK A และ SUK B ถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ด้วย Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มซีรีนโปรติเอส แต่ไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วย EDTA ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเมทธัลโรโปรติเอส แสดงใ ห้เห็นว่าเอนไซม์เคราติเนส จาก *B. licheniformis* KUB- K0006 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเอส (สุดาทิพย์, 2546)

2.4 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์เคราติเนสในด้านต่างๆ

นอกจาก การ ใช้ประโยชน์จาก เอนไซม์เคราติเน สในการผลิต ขนไก่ป่น ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ยังมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์เคราติเนสในงานด้านอื่นๆได้ดังนี้

2.4.1 การผลิตปุ๋ย เนื่องจากในขนไก่ป่นที่ ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เคราติเนส พบว่ามีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถ นำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของพืชได้ และยังช่วยเพิ่มกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ในดินและปรับโครงสร้างของดินให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังผลิตได้ง่ายและราคาไม่แพง (Gupta and Ramnani, 2006)

2.4.2 การรักษาโรค การเกิดโรค transmissible spongiform encephalophathies (TSE) หรือโรคสมองฝ่อ มี สาเหตุจากไพรออนไปทำให้เกิดการเสื่อมของระบบประสาท โดยไพรออนจะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไปเปลี่ยนโปรตีน PrPc ให้อยู่ในรูป PrPsc ที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่อยู่ในรูปเบต้าชีท (β-sheet) จากการศึกษา พบว่าการใช้เอนไซม์เคราติเนสร่วมกับผงซักฟอกและความร้อนจะทำให้สามารถย่อย PrPsc ได้ (Langeveld *et al*., 2003) นอกจากนี้เอนไซม์เคราติเนสได้ถูกนำไปใช้ในการนำส่ง ยาในบริเวณที่ยาซึมผ่านได้ยาก โดยพบว่าการใช้เอนไซม์เคราติเนสร่วมกับยาจะช่วยให้ยาซึมผ่านเล็บได้ดียิ่งขึ้น (Mohorcic *et al.*, 2007)

2.4.3 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังขั้นตอนการกำจัดขนสัตว์ออกจากแผ่นหนัง เนื่องจากต้องใช้สารเคมีหลายชนิดจึงทำให้เกิดมลพิษขึ้นได้ ดังนั้นจึงมีการนำเอาเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เช่น ไลเปส และคาร์โบไฮเดรส นอกจากนี้เอนไซม์เคราติเนสจะไม่ทำลายคอลลาเจนในแผ่นหนัง อีกทั้งเอนไซม์เคราติเนสยังมี คุณสมบัติ elastolytic activity ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดข นสัตว์บนแผ่นหนังได้ดีขึ้น (Macedo *et al.*, 2005)

2.4.4 อุตสาหกรรมผงซักฟอก เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เอนไซม์ที่ ใช้ส่วนใหญ่ อยู่ในกลุ่ม alkaline protease มีการใช้เอนไซม์เคราติเนสในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เนื่องจากเอนไซม์สามารถจับและย่อยสับสเตรทที่เป็นของแข็งได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ สำคัญของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมนี้ เพราะเอนไซม์ต้องไปจับและย่อยโปรตีนที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของเสื้อผ้า (Gassesse *et al.*, 2004) นอกจากนี้เอนไซม์เคราติเนสยังช่วยย่อยเศษผมที่ติดตามท่อระบายน้ำอีกด้วย (Farag and Hansan, 2004)

2.4.5 การผลิตก๊าซชีวภาพ เริ่มต้นขั้นตอนแรกทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* เพื่อให้ผลิตเอนไซม์เคราติเนส จากนั้น เอนไซม์เคราติเนส จะไปเปลี่ยนเคราตินในสับสเตรทให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน ซึ่งจะใช้เป็นอาหารสำหรับเชื้อ *Thermococcus litoralis* เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพในขั้นตอนที่สองต่อไป (Bálint *et al.,* 2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การแสดงออกของยีน (Protein expression)

3.1 เซลล์เจ้าบ้าน (Host cell)

3.1.1 *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่นิยมนำมาใช้ในการโคลนและศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนหลายชนิด เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ที่สูง เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า (generation time) นั้นสั้นเพียง 20 นาที (Lederberg, 2004) และสามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่ใช่ complex medium ที่มีวิตามินในปริมาณสูง แต่เป็นอาหารที่ ไม่ต้องมีองค์ประกอบซับซ้อน ก็สามารถเจริญได้ อีกทั้งยังมีการศึกษากระบวนการต่างๆภายในเซลล์และมีการศึกษาแผนที่จีโนมทั้งหมดของ *E. coli* แล้ว อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบเมื่อใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน คือโปรตีนที่ผลิตมักถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งการสะสมเอนไซม์ไว้ในเซลล์นี้ทำให้โปรตีนเกิดการจับกันอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เกิดการม้วนพับของโปรตีนที่ผิดปกติไป ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Schallmey *et al.*, 2004) วิธีการแก้ปัญหานี้หนทางหนึ่ง คือการทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้นี้หลั่งออกสู่บริเวณ periplasmic ของเซลล์เมมเบรน หรือหลั่งออกไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ซึ่งในการผลิตเอนไซม์ให้หลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์นี้จะมีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น ง่ายต่อการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ หลีกเลี่ยงการถูกทำลายจากเอนไซม์โปรตีเอสอื่นๆ นอกจากนั้นยังเพิ่มโอกาสในการเกิดการม้วนพับของโปรตีนที่ถูกต้องได้มากยิ่งขึ้น (Choi and Lee, 2004) *E. coli* มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการผลิตโปรตีนดังนั้นจึงเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมมากสำหรับใช้ในการแสดงออกของยีน (Lee 1996 และ Makrides 1996)

Maciver *et al.* (1994) ศึกษาการแสดงออกของยีน serine protease จาก *Bacillus* sp. Ak1 โดยใช้ pJLA602 เป็นดีเอ็นเอพาหะที่มีส่วนของ *atpE* signal sequence เพื่อให้โปรตีนที่ผลิตสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ และใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งหลังจากการแสดงออกพบว่าระบบที่ใช้สามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้

Lin *et al.* (2009) ศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวคเตอร์ pET-43b(+) จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* AD494(DE3)pLysS และหลังจากเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนด้วย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์เคราติเนสถูกผลิตภายใน เซลล์ (intracellular protein) ซึ่งได้นำส่วนใสหลังจากทำให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลล์แตกซึ่งมีเอนไซม์เคราติเนสอยู่ด้วยนั้นไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สามารถแสดงค่า specific activity ได้ 12 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Tiwary and Gupta (2010) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* ER-15 โดยโคลนยีนเข้าเวคเตอร์ pEZZ18 สำหรับการผลิตเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าระบบการแสดงออกนี้สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสออกสู่ภายนอกเซลล์ได้และแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนส 11.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเหนี่ยวนำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharma and Gupta (2010) ที่ใช้ระบบการแสดงออกแบบเดียวกันคือใช้เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกและเซลล์เจ้าบ้านชนิดเดียวกันในการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *P. aeruginosa* KS-1 ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสออกสู่ภายนอกเซลล์ได้เช่นเดียวกันโดยแสดงค่า specific activity เท่ากับ 3.7 กิโลยูนิตต่อมิลลิกรัม (kU/mg)

3.1.2 *Pichia pastoris* เป็นยีสต์เซลล์เดียวสามารถใช้เมท านอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (methylotrophic yeasts) และเนื่องจากเป็นเซลล์ eukaryotic ทำให้มีข้อได้เปรียบในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งขบวนการ post-translational modifications เช่น glycosylation, disulphide bond formation, folding, proteolytic processing (Cregg *et al.,* 2000) ซึ่งสามารถทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตมีโครงสร้างหรือการม้วนพับของโปรตีนที่ถูกต้องและอยู่ในรูปที่ทำงานได้ เช่น G protein-coupled receptors ซึ่งไม่สามารถแสดงออกในระบบ bacteria, *Saccharomyces cerevisiae*, insect cell/baculovirus ได้ แต่โปรตีนนี้สามารถแสดงออกได้เมื่อเปลี่ยนมาใช้ระบบ *P. pastoris* ในการแสดงออก (Cereghino *et al*., 2001; Cereghino *et al*., 2002; Chen *et al*., 2004) นอกจากนั้นยังมีโปรตีนจำนวนมากที่ถูกผลิตออกมาอยู่ในรูป inactive inclusion body จากการแสดงออกในระบบ bacteria แต่เมื่อนำไปแสดงออกในระบบ *P. pastoris* สามารถผลิตโปรตีนในรูป active molecules ได้ (Cregg, n.d.) โดยปกติการแสดงออกโดยระบบ *P. pastoris* สามารถให้ผลผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณที่สูงและมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีการควบคุมอย่างเข้มงวดและมีระดับการเหนี่ยวนำที่สูงของ *AOX I* (alchohol oxidase I) promoter ที่อยู่บนเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกในกรณีนี้จะทำการเหนี่ยวนำโปรโมเตอร์ด้วยเมทานอล และเวคเตอร์ที่ใช้แสดงออกในระบบ *P. pastoris* จะเป็น integrated vector โดยสามารถรวมเข้าเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม ของ *P. pastoris* ซึ่งช่วยให้พันธุกรรมของยีสต์ลูกผสมมีความเสถียรซึ่งเ ป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องหรือการขยายขนาดการผลิตในถังหมัก (Romanos, 1995) และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตโปรตีนในถังหมักยังสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อโปรตีนที่ผลิตได้ เช่น pH, aeration, carbon source หรือ feed rate (Higgins and Cregg, 1998) ได้ง่ายขึ้น รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ส่วนใหญ่สามารถผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ โดยอาศัย secretion signal sequence ที่อยู่บนเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกซึ่งส่วนใหญ่ได้รับมาจาก *Saccharomyces cerevisiae* เช่น alpha factor prepro peptide (Cregg *et al*., 1993; Scorer *et al*., 1993) และโปรตีนที่ถูกผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์ยังมีข้อได้เปรียบ เนื่องจาก ยังไม่มีเอกสารยืนยันอย่างแน่นอนว่า *P. pastoris* ผลิตเอนไซม์ protease ออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular proteases) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ายีสต์ปลดปล่อย endogenous protein ออกสู่ภายนอกเซลล์ในระดับต่ำเท่านั้น (Cereghino and Cregg, 2000; Jahic, 2003) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ง่ายต่อการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ในขณะที่การจัดการง่ายเหมือนกับ *E. coli* หรือ *S. cerevisiae* ดังนั้นด้วยเหตุผลเหล่านี้ *P. pastoris* จึงเป็นอีกทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของ heterologous protein

Noronha *et al.* (2002) ศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Aspergillus fumigatus* Fresenius โดยทำการสังเคราะห์ cDNA ของยีนเคราติเนสด้วยวิธี อาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) จากนั้นนำ cDNA โคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pHILD-2 สำหรับการแสดงออกใน *P. pastoris* SMD 1165 หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยเมทานอล พบว่าเอนไซม์เคราติเนสสามารถผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ เมื่อนำ น้ำเลี้ยงเซลล์ มาทดสอบพบว่าสามารถแสดงกิจกรรมของ caseinolytic, azo-keratinolytic และ keratinolytic ได้ และในการทดสอบการย่อย native feather flour โดยน้ำเลี้ยงเซลล์ จนครบ 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักแห้งของ native feather flour หายไป 10 เปอร์เซ็นต์

3.2 ดีเอ็นเอพาหะ (vector)

3.2.1 ดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกใน *Escherichia coli*

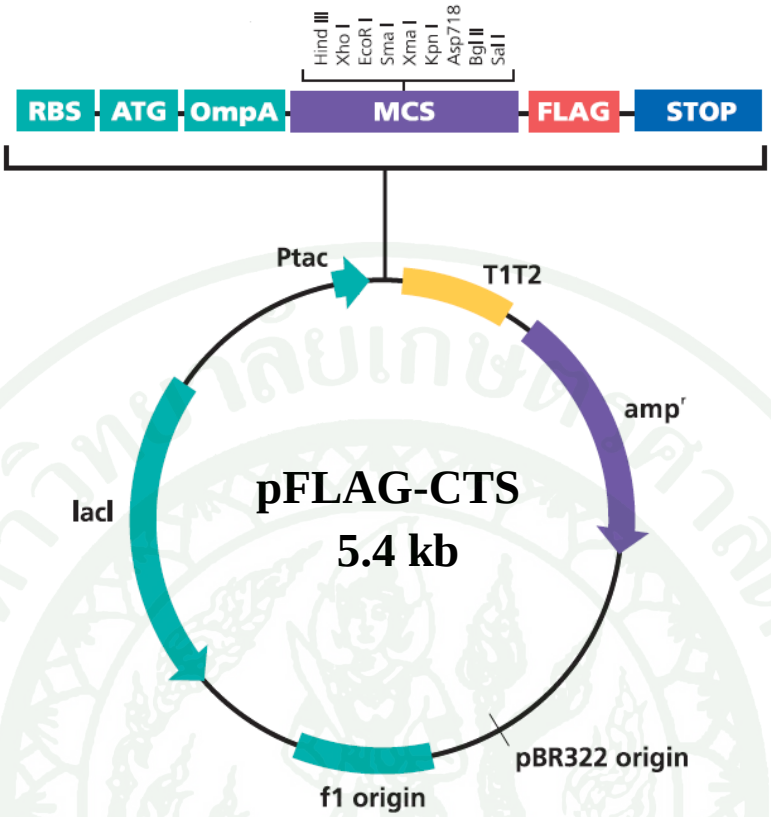
pFLAG-CTS expression vector มีขนาด 5.4 kb เป็นเวคเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ซึ่งโปรตีนสามารถแสดงออกไปยังส่วน periplasmic ของเซลล์ได้ และสามารถออกแบบให้บริเวณ C-terminal ของโปรตีนรวมเข้ากับส่วน FLAG® fusion protein ที่มีตำแหน่งอยู่บนเวคเตอร์ ซึ่ง FLAG เป็น epitope ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ตัว ที่มีแขนงข้างเป็นหมู่ที่มีประจุหรือมีขั้วซึ่งมีความไวในการเข้าจับกับ ANTI-FLAG® ส่งผลให้การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูง สำหรับโปรโมเตอร์ที่ใช้คือ *tac* promoter ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *trp* promoter และ *lac* promoter จึงส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการ transcription สูง การ transcription จะถูกควบคุมโดย *lacO* sequences และ *lac* repressor gene (*lacI*) นอกจากนั้นยังมีส่วน *omp*A signal sequence ทำให้โปรตีนที่ถูกผลิตออกมายังส่วน periplasmic นั้นสามารถหลั่งสู่ภายนอกเซลล์ได้ และเวคเตอร์มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เป็น selective marker (Sigma, USA)

Yamabhai *et al.* (2008) ทำการศึกษาการหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ โดยใช้ระบบการแสดงออกใน *E. coli* โดยทำการโคลนยีนผลิตเอนไซม์ แอลฟา -อะมิเลส แมนนาเนส ไคติเนส ที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* DSM 8785 *B. subtilis* 168 และ *B. licheniformis* DMS13 ตามลำดับ โดยยีนที่มี native signal peptides เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pET21d(+) ส่วนยีนที่ไม่มี native signal peptides เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pFLAG-CTS จากนั้นถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* strain TOP10 ตามลำดับ และเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยการเติม isopropyl- beta-D-thiogalactoside (IPTG) จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ผลจากการศึกษาพบว่าโคลนทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการและหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ ทำให้คาดได้ว่า signal peptides ของแบซิลัสทั้ง 3 สายพันธุ์ และ OmpA (outer membrane protein) ซึ่งเป็น signal peptide ที่มีตำแหน่งอยู่บนเวคเตอร์ pFLAG-CTS นั้นสามารถถูกจดจำได้โดยระบบการหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ของ *E. coli* ลักษณะพลาสมิด pFLAG-CTS แสดงดังภาพที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



pFLAG-CTS Features

Feature	Map Position
N-26 Sequencing Primer Binding Site	1-26
tac Promoter	39-99
lacO	73-93
Ribosomal Binding Site	100-105
ompA	112-174
MCS	170-207
FLAG tag	205-228
C-24 Sequencing Primer Binding Site	255-278
T1/T2 terminator	286-656
β-lactamase (amp^r)	755-1612
pBR322 ori	1820-1939
f1 ori	2603-3066
lacI	3744-4826

ภาพที่ 4 พลาสมิด pFLAG-CTS

ที่มา : Sigma-Aldrich Co. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

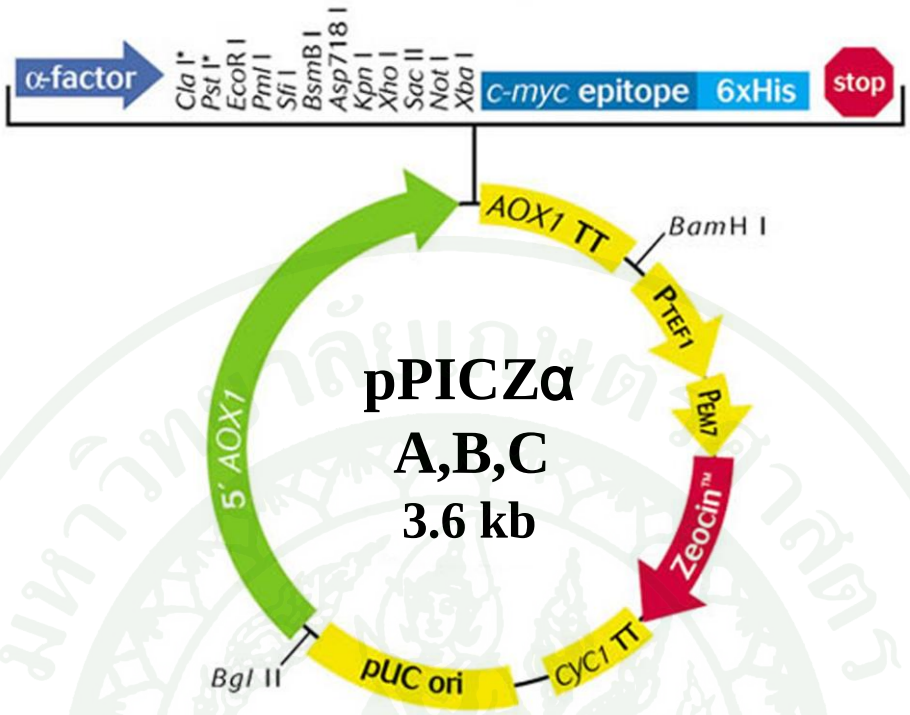
3.2.2 ดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกใน *Pichia pastoris*

pPICZα B expression vector มีขนาด 3.6 kb เป็นเวคเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกและการปลดปล่อยรีคอมบิแน นท์โปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ โดยใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แสดงออกจะรวมเข้ากับส่วน α-factor secretion signal บริเวณ N-terminal ซึ่ง α-factor secretion signal ที่ได้รับมาจาก *S. cerevisiae* มีหน้าที่ขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ เวคเตอร์นี้ สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สนใจให้แสดงออกในระดับสูงได้ด้วย methanol ในการเหนี่ยวนำด้วย methanol นี้จะถูกควบคุมโดย *AOX I* promoter นอกจากนี้เวคเตอร์ยังมีส่วน *c-myc* epitope และ polyhistidine (6×His) Tag ไว้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Zeocin (invitrogen, USA)

Porres *et al.* (2002) ศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* PWD-1 โดยโคลนยีนเข้าสู่เวคเตอร์ pPICZα A สำหรับการแสดงออกใน methylotrophic yeast ซึ่งได้แก่ *P. pastoris* X33 พบว่ารีคอมบิแนนท์เคร าติเนสถูกผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสเพิ่มขึ้นอย่างคงที่จนครบเวลา 144 ชั่วโมงของการเก็บตัวอย่างซึ่งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้สูงสุดเท่ากับ 285 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Radha and Gunasekaran (2009) ศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* MKU3 โดยทำการโคลนยีนและให้ยีนแสดงออกใน *B. megaterium* MS941 และ *P. pastoris* X33 โดยใช้เวคเตอร์สำหรับการแสดงออก pWH1520 และ pPICZα A ตามลำดับพบว่าเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 ชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ผลิตได้กับเอนไซม์เคราติเนสจากเชื้อดั้งเดิมพบว่าเซลล์ลูกผสม *B. megaterium* ผลิตเอนไซม์เคราติเนสเพิ่มขึ้น 3 เท่าและวัดขนาดโปรตีนได้ 30 กิโลดาลตัน ในขณะที่เซลล์ลูกผสม *P. pastoris* ผลิตเอนไซม์เคราติเนสเพิ่มขึ้น 2.9 เท่าและวัดขนาดโปรตีนได้ 39 กิโลดาลตันซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าขนาดโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ยีสต์ลูกผสมมี ขนาดเพิ่มขึ้นจากกระบวนการ glycosylation ของเซลล์ยีสต์ และยังส่งผลให้เอนไซม์มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นโด ยที่ pH 11 สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสไว้ได้ 95 เปอร์เซ็นต์และที่ 80 องศาเซลเซียสรักษากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสไว้ได้ 75 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นผลดีต่อกระบวนการพัฒนาต่อในอุตสาหกรรม ลักษณะพลาสมิด pPICZα B แสดงดังภาพที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



* *Pst* I is in Version B only
Cla I is in Version C only

Comments for pPICZα A
3593 nucleotides

5´ *AOX1* promoter region: bases 1-941
5´ *AOX1* priming site: bases 855-875
α-factor signal sequence: bases 941-1207
Multiple cloning site: bases 1208-1276
c-myc epitope: bases 1275-1304
Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337
3´ *AOX1* priming site: bases 1423-1443
AOX1 transcription termination region: bases 1341-1682
TEF1 promoter: bases 1683-2093
EM7 promoter: bases 2095-2162
Sh ble ORF: bases 2163-2537
CYC1 transcription termination region: bases 2538-2855
pUC origin: bases 2866-3539 (complementary strand)

ภาพที่ 5 พลาสมิด pPICZα B

ที่มา : Invitrogen. (2010b)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 การแสดงออกของยีนเคราติเนส

เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ซึ่งได้มีผู้ที่ศึกษามาก่อนหน้าโดยใช้ระบบการแสดงออกและวิธีการศึกษาที่แตกต่างกันไป แต่ก็พบว่ายังมีปัญหาและอุปสรรคในการศึกษาการแสดงออกของยีนอยู่ ดังนั้นในส่วนนี้จึงขอยกตัวอย่างงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Bacillus* sp. เพื่อชี้ให้เห็นถึงปัจจัยที่มีส่วนสำคัญต่อการแสดงออกของยีน

กฤษณี (2545) ศึกษาการโคลนยีนแสดงเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบสที่เตรียมจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 โดยใช้พลาสมิด pUB110 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบเซลล์ลูกผสมที่แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนส ได้สูงถึง 6.45 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมมาตรวจสอบหายีนเคราติเนสกลับพบว่าไม่สามารถตัดพลาสมิดลูกผสมได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bgl*II, *Xba*I และ *Pvu*II ที่มีตำแหน่งตัดอยู่บน pUB110 ซึ่งอาจเกิดจากความไม่คงตัวของพลาสมิด ลูกผสมโดยดีเอ็นเอลูกผสมอาจ เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงไม่สามารถที่จะเข้าตัดได้ นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบชนิดของ ยีนเคราติเนสโดยการทำ Southern blot และไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ โพรบที่ออกแบบจาก pUB110, ยีน *suk A* และ *suk B* เป็นตัวติดตาม พบว่าพลาสมิด pUB110 เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอลูกผสม แต่ไม่พบการสัญญาณการจับเข้าคู่กันเมื่อใช้โพรบที่ออกแบบจาก *suk A* และ *suk B* เป็นตัวติดตาม จึงเป็นไปได้ว่ายีนที่โคลนได้มีการแสดงออกถึง เอนไซม์เคราติเนสชนิดอื่นจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 นอกเหนือจาก *suk*A และ *suk*B ซึ่งสามารถแสดงกิจกรรมเอนไซม์เคราติเนสได้เช่นกัน

ณัฐวดี (2546) ศึกษาการโคลนยีน *suk C* ซึ่งแสดงเอนไซม์เคราติเนสจากเชื้อ *B. pumilus* KUB-K0082 โดยโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบสที่เตรียมจากเชื้อ *B. pumilus* KUB-K0082 เข้าสู่ *B. subtilis* 1A751 โดยใช้พลาสมิด pUB110 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบเซลล์ลูกผสมที่แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนสเท่ากับ 2.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสมมีขนาด 22 กิโลเบส แต่ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Bam*HI, *Pvu*II และ *Xba*I ซึ่งอาจเกิดจากชิ้นดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย พลาสมิด pUB110 และยีนเคราติเนสเกิดการเรียงตัวเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้นเมื่ออยู่ในเซลล์ของ *B. subtilis* 1A751 จึงไม่สามารถตรวจสอบขนาดของยีนเคราติเนสได้ จากนั้นจึงโคลนดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ใน *E. coli* DH5α โดยใช้พลาสมิด pUC19

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบเซลล์ลูกผสมที่มีพลาสมิดลูกผสมขนาด 19.3 กิโลเบส แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนส 1.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมมาตรวจสอบหายีนเคราติเนส พบว่าไม่สามารถตัดพลาสมิดลูกผสมได้ด้วยเอนไซม์ *AccI* และ *ScaI* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการโคลนยีน ซึ่งอาจเกิดจากบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวถูกทำลายไประหว่างการโคลน

ขวัญคณิศร์ (2551) ศึกษาการโคลนยีนแสดงเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-6 กิโลเบสที่เตรียมจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยใช้พลาสมิด pHT43 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบว่าโคลน e101 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส 5.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อนำโคลน e101 มาเลี้ยงอีกครั้งเพื่อนำสารละลายเอนไซม์ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราติเนส กลับพบว่าโคลนไม่มีการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส นอกจากนี้ได้ถ่ายโอนพลาสมิดจากโคลน e101 เข้าสู่ *E. coli* DH5α อีกครั้ง แล้วตรวจสอบความสามารถของโคลนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์เคราติเนส พบว่าโคลนที่ได้ไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสเช่นกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากความไม่เสถียรของพลาสมิดที่เมื่อมีการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องหลายๆรุ่น จากนั้นจึงได้ทำการโคลนยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วแสดงออกใน *B. subtilis* 1A751 โดยใช้ pHT43 เป็นดีเอ็นเอพาหะ และจากการคัดเลือกโคลนด้วยการทำพีซีอาร์พบว่าทุกโคลนมียีนเคราติเนสอยู่ แต่โคลนไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้ อาจเกิดเนื่องจากโปรโมเตอร์ที่ใช้ ไม่เหมาะสมกับยีนที่ต้องการแสดงออกหรือเอนไซม์ที่ผลิตอาจไม่อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้เนื่องจากการม้วนพับของโปรตีนที่ไม่ถูกต้อง นอกจากนี้อาจเกิดจาก signal peptide ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนออกนอกเซลล์ไม่เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ที่เลือกใช้หรือเกิดปัญหาความจากความไม่เสถียรของพลาสมิด

Pan *et al.* (2004) โคลนยีน *AP* ซึ่งแสดงเอนไซม์เคราติเนส จาก *B. pumillus* UN-31-C-42 โดยใช้พลาสมิด pET15b เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เคราติเนสใน *E. coli* XL1-blue พบว่าเซลล์ลูกผสมสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้แต่ไม่สามารถแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ จึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสใน *B. subtilis* WB600 โดยสร้างพลาสมิดลูกผสมที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ Bp53 (จาก *B. pumillus* UN-31-C-42) ยีน *AP* และใช้ pSUGV4 เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบว่าโคลนสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้ แต่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสต่ำ คือ 32.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คาดว่าสาเหตุเนื่องจากโปรโมเตอร์ที่ใช้อาจไม่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Radha and Gunasekaran (2007) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* MKU3 ภายใต้ *PxylA* promoter และ *PamyL* promoter โดยใช้พลาสมิด pWH1520 ซึ่งมี *PxylA* promoter อยู่ก่อนแล้ว ส่วน *PamyL* promoter ได้ทำการตัดต่อเพื่อศึกษาภายหลัง เมื่อได้ดีเอ็นเอลูกผสมที่ต้องการจึงทำการถ่ายโอนดี เอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *B. megaterium* MS941 เพื่อผลิตเอนไซม์เคราติเนส พบว่าเซลล์ลูกผสมที่มี *PxylA* promoter จะมีการแสดงออกของ ยีนเคราติเนสสูงกว่าเซลล์ลูกผสมที่มี *PamyL* promoter และสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. licheniformis* MKU3) ประมาณ 3.4 เท่า และพบว่าเซลล์ลูกผสม *B. megaterium* MS941 (pWHK3) แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เคราติเนสได้สูงที่สุดคือ 186.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยการเติม xylose จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากผลที่ได้นี้ทำให้คาดได้ว่า xylose inducible promoter มีประสิทธิภาพมากกว่า α-amylase promoter สำหรับการแสดงออกของ ยีนเคราติเนสใน *B. megaterium* MS941

Porres *et al.* (2002) ศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนส (*kerA*) จาก *B. licheniformis* PWD-1 โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะ 2 ชนิดคือ pPICZαA ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย inducible *AOX1* promoter และ pGAPZαA ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย constitutive *GAP* promoter เมื่อได้พลาสมิดลูกผสมที่ต้องการแล้วจึงถ่ายทอดสู่ *P. pastoris* X33 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออก พบว่าเซลล์ยีสต์ลูกผสม pPICZαA - *kerA* และ pGAPZαA- *kerA* มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เคราติเนสได้ทั้งคู่ แต่การแสดงออกของโปรตีนจากยีสต์ pPICZαA - *kerA* มีการแสดงออกที่สูงกว่า ยีสต์ pGAPZ αA-*kerA* ซึ่งเป็นผลมาจาก inducible *AOX 1* promoter ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า constitutive *GAP* promoter โดยพบว่ามีการสร้างรีคอมบิแนนท์เคราติเนสหลังจากการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 24 ชั่วโมง และมีการผลิตสูงสุดที่ 124 มิลลิกรัมต่อลิตร (285 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) หลังจากการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

จากการศึกษาที่ มีมาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการที่จะประสบความสำเร็จในการโคลนและการแสดงออกของยีนนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการแต่ปัจจัยที่สำคัญ ที่ต้องคำนึง ถึงก็คือระบบที่ใช้ในการแสดงออกที่ประกอบไปด้วย ยีนเคราติเนส เซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกและเวคเตอร์สำหรับการแสดงออ ก ซึ่งถ้าระบบที่ใช้มีความเหมาะสมจะทำให้โอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการแสดงออกของยีนมีมากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นแหล่งของยีนเคราติเนส

แบคทีเรีย *E. coli* DH5α (pGKER51) ที่มียีนเคราติเนสอยู่บน พลาสมิดลูกผสม pGKER51 จากวิทยานิพนธ์ของขวัญคณิศร์ (ขวัญคณิศร์, 2551)

2. สายพันธุ์เซลล์เจ้าบ้าน

2.1 แบคทีเรีย *E. coli* DH5α (Invitrogen , USA) ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด เป็นสายพันธุ์เอนกประสงค์ที่ใช้ในงาน cloning อยู่เป็นประจำ สามารถเพิ่มปริมาณพลาสมิดได้มาก และพลาสมิดมีความเสถียร เป็นสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Nalidixic acid

2.2 แบคทีเรีย *E. coli* Rosetta (Novagen, USA) ใช้สำหรับการแสดงออกของยีน ถูกพัฒนามาจากสายพันธุ์ BL21 เป็นสายพันธุ์ที่ออกแบบมาเพื่อเพิ่มศักยภาพในการแสดงออก เนื่องจากสามารถใช้ rare codons ที่พบใน *E. coli* ได้ ซึ่งยีนเคราติเนสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามี rare codons รวมอยู่ด้วย เป็นสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol

2.3 แบคทีเรีย *E. coli* TOP10 (Invitrogen , USA) ใช้สำหรับการแสดงออกของยีน เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการ transformation ของ supercoiled DNA สูง เหมาะสมสำหรับการ cloning ที่ต้องการประสิทธิภาพและการเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มีความเสถียร เป็นสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Streptomycin

2.4 ยีสต์ *P. pastoris* Y11430 (Northern Regional Research Center , Peoria, IL) เป็นยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมใช้สำหรับการแสดงออกของยีน มีความสามารถในการใช้เมทานอลเพราะมียีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส 2 ชนิด คือ *AOX I* และ *AOX II* และเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มียีนที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ ดังนั้นพลาสมิดที่ใช้ควรมี selectable marker ในกลุ่ม antibiotic marker

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. พลาสมิดสำหรับโคลนยีน

3.1 pGEM-T easy vector (Promega, USA) เวคเตอร์ประกอบด้วย T7 promoter และ SP6 RNA polymerase promoter มียีนควบคุมการผลิตเอนไซม์กาแลคโตซิเดสเป็น reporter gene สำหรับการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ ซึ่งจะแสดง blue/white screening เป็นตัวบ่งชี้บนเพลท และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เป็นผลิตภัณฑ์ในชุด pGEM®-T Easy Vector Systems

3.2 pTZ57R/T vector (Fermentas, USA) เวคเตอร์ประกอบด้วย T7 promoter มียีนควบคุมการผลิตเอนไซม์กาแลคโตซิเดสเป็น reporter gene สำหรับการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ ซึ่งจะแสดง blue/white screening เป็นตัวบ่งชี้บนเพลท และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน เป็นผลิตภัณฑ์ในชุด InsTAclone™ PCR Cloning Kit

3.3 pFLAG-CTS expression vector (Sigma, USA) เวคเตอร์ประกอบด้วย *tac* promoter ควบคุมการ transcription ด้วย *lacO* และ *lacI* นอกจากนั้นยังมีส่วน *omp*A signal sequence ทำให้โปรตีนที่ถูกผลิตออกมายังส่วน periplasmic นั้นสามารถหลั่งสู่ภายนอกเซลล์ และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. มณฑารพ ยมาภัย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 pPICZα B expression vector (Invitrogen, USA) เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกใน *P. pastoris* ประกอบด้วย *AOX I* promoter ทำให้ใช้ methanol เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนได้ มีส่วน α-factor secretion signal ทำหน้าที่ขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ มีส่วน polyhistidine (6×His) Tag เพื่อประสิทธิภาพในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Zeocin

4. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสมีทั้งหมด 2 คู่ (ตารางที่ 3) โดยคู่ที่ 1 ออกแบบมาเพื่อให้เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pFLAG-CTS สำหรับแสดงออกใน *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10 ทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 2 นั้นออกแบบมาเพื่อให้เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pPICZα B สำหรับใช้แสดงออกใน *P. pastoris* Y11430 ซึ่งวิธีการออกแบบไพรเมอร์นั้นใช้หลักการที่คล้ายกัน จึงยกตัวอย่างวิธีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเป็นตัวอย่าง 1 คู่ ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเคราติเนส ให้สามารถเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pFLAG-CTS เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10 ประกอบด้วยไพรเมอร์เส้น FORWARD คือ FKER ไพรเมอร์เส้น REVESE คือ RKER ในการออกแบบไพรเมอร์ทั้งสองเส้นนั้นจะมีส่วนที่ complementary กับลำดับเบสบนเส้นดีเอ็นเอของยีนเคราติเนส ที่เราสนใจ (บริเวณที่ขีดเส้นใต้สีดำ) โดยไพรเมอร์ FKER มีส่วนที่ complementary กับลำดับเบสบริเวณด้านปลาย 3′ ไปยัง 5′ของดีเอ็นเอเส้น coding strand (non-template strand) ส่วนไพรเมอร์ RKER มีส่วนที่ complementary กับลำดับเบสบริเวณด้านปลาย 5′ ไปยัง 3′ ของดีเอ็นเอเส้น noncoding strand (template strand) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นจะมีส่วน linkers (บริเวณที่ขีดเส้นใต้สีส้ม) ต่ออยู่ด้วย ซึ่งส่วน linkers นี้จะมีบริเวณ recognition site ของ restriction enzyme (แทนด้วยตัวอักษรสีน้ำเงิน) โดยไพรเมอร์ FKER จะมีบริเวณ recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I ส่วนไพรเมอร์ RKER จะมีบริเวณ recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และนอกจากนั้นไพรเมอร์ RKER ยังประกอบด้วยส่วนที่เป็น stop codon (บริเวณที่ขีดเส้นใต้สีเขียว) และส่วนที่จะแปลรหัสไปเป็นเป็นกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 โมเลกุล (บริเวณที่ขีดเส้นใต้สี ชมพู) เพื่อให้สามารถใช้วิธี Affinity chromatography (with HIS-tagged proteins) ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้

ตารางที่ 3 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเคราติเนสเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10	
FKER	5’ TGG GTA CCT CTG CTG CTC AGC CGG CGA A 3’
RKER	5’ GAA GAT CTT TAA TGA TGA TGA TGA TGA TGT TGA GCG GCA GCT TCG ACA T 3’
ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเคราติเนสเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนใน *P. pastoris* Y11430	
FPIC1	5’ AAGGTTGGTACCAATCTGCTGCTCAGCCGGCGAA 3’
RPIC1	5’ AACCTTTCTAGACCTTGAGCGGCAGCTTCGACAT 3’

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. เอนไซม์ และสารเคมี

5.1 *Kpn*I (Biolabs, USA)

5.2 *Bgl*II (Biolabs, USA)

5.3 *Xba*I (Fermentas, USA)

5.4 *Sac*I **(**Fermentas, USA)

5.5 T4 DNA ligase (Promega, USA)

5.6 DynazymeII *Taq* DNA Polymerase (Finzyme, Finland)

5.7 pGEM® -T Easy Vector Systems (Promega, USA)

5.8 InsTAclone™ PCR Cloning Kit **(**Fermentas, USA)

5.9 QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN, USA)

5.10 NucleoSpin extract II® (Machere-Nagel, USA)

5.11 Agarose (Research organics, USA)

5.12 RNase (Fermentas, USA)

5.13 6X loading dye (Fermentas, USA)

5.14 1 Kb DNA marker (Fermentas, USA)

5.15 Phenol (Amresco, USA)

5.16 Chroloform (Merks, Germany)

5.17 Ethylene diamine tetraacetic acid (Sigma, USA)

5.18 $CaCl_2$ (Sigma, USA)

5.19 $MgCl_2$ (Sigma, USA)

5.20 $CuSO_4$ (Sigma, USA)

5.21 $MnCl_2$ (Sigma, USA)

5.22 $ZnSO_4$ (Sigma, USA)

5.23 SDS (Sigma, USA)

5.24 Methanol (Sigma, USA)

5.25 Ethanol (Sigma, USA)

5.26 Dimethyl sulfoxide (Sigma, USA)

5.27 Isopropyl alcohol (Sigma, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. เครื่องมือ

6.1 Balance (Mettler Toledo, ML 3002/01)

6.2 Laminar flow (Nuaire, NU-440-400E)

6.3 Incubator (WTB Binder, BD with R3-controller)

6.4 Vortex mixer (LMS mixer uzusio, VTX-3000L)

6.5 Autoclave (TOMY, ES-315)

6.6 Spectrophotometer (Cecil, CE 7250)

6.7 Incubator shaker (Vision, VS-8480SRN)

6.8 pH meter (Mettler Toledo, five easy FE20)

6.9 Water bath (Lauda, A 100)

6.10 Centrifuge (Tomy, MX-301)

6.11 Agarose gel electrophoresis (Minigel electrophoresis unit, Mu-Pid2)

6.12 Micro wave (LG, MS2127CW)

6.13 Freezer -20 ºC (Sharp)

6.14 Freezer -80 ºC (Heto Ultra Freeze, Ultrafreeze 237)

6.15 Benchtop UV Transilluminator (Vilber Lourmat, TF20)

6.16 Gel document (Vilber Lourmat)

6.17 Micropipette (Gilson, pipetman)

6.18 Dionized water (Millipore Q-gard2, QGARDOOD2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การแสดงออกของยีนเคราติเนสใน *Escherichia coli* Rosetta และ *Escherichia coli* TOP10

การศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสใน *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ทำการใช้พลาสมิด pFLAG-CTS expression vector ในการสร้างพลาสมิดลูกผสม pFKER สำหรับการแสดงออกของยีนเคราติเนส ดังนั้นในส่วนรายละเอียดวิธี ขั้นตอนที่ใช้ศึกษานั้นเหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันเพียงเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้แสดงออกเท่านั้น

1.1 การเตรียมพลาสมิดลูกผสม

1.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA)

วิธีการสกัดพลาสมิด ลูกผสม pGKER51 ที่มียีนเคราติเนสอยู่ จากเชื้อ *E. coli* DH5α (pGKER51) ที่ได้จากวิทยานิพนธ์ของขวัญคณิศร์ (ขวัญคณิศร์, 2551) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเตรียมยีนเคราติเนสที่ไม่มีส่วนของ signal peptide ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep®Spin miniprep kit (Qiagen, USA) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้งแล้วเติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วเติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 มิลลิลิตรทันทีผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 750 มิลลิลิตรใส่ลงในคอลัมน์และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมบัฟเฟอร์ NE ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่ไหลผ่านลงคอลัมน์ด้านล่างทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นชะดีเอ็นเอออกจากเมมเบรนโดยใช้บัฟเฟอร์ EB หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายพลาสมิดที่ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.2 การเตรียมยีนเคราติเนสที่ไม่มีส่วนของ signal peptide

เพิ่มปริมาณยีนเคราติเนสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction ; PCR) โดยเตรียม Master mix ที่ประกอบไปด้วย

10x buffer with Mg	2.5	ไมโครลิตร
dNTPs 10 มิลลิโมลาร์	0.5	ไมโครลิตร
FKER Primer 5 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร	2.5	ไมโครลิตร
RKER Primer 5 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร	2.5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5	ไมโครลิตร
Nuclease free water	16	ไมโครลิตร

มาผสมกับดีเอ็นเอแม่แบบปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จนได้ปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันนำไปทำปฏิกิริยา ด้วยเครื่อง Thermal cycle (T-gradient, Biometra) โดยมีสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 pre-denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ	
โปรแกรมที่ 2 denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที	
annealing	ที่ 70 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที	
extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที วนรอบ 3 ขั้นตอนจำนวน 30 รอบ	
โปรแกรมที่ 3 extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ	

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟริซิส จากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin Extract II® แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราติเนสเข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pGKER โดยใช้อัตราส่วน พลาสมิด:ดีเอ็นเอ (1:3) ใช้ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 2X Rapid ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อให้ปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pGKER เข้าสู่ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.3 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pGKER เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม

1.1.3.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Dagert and Ehrlich (1979) โดยเขี่ยเชื้อ *E. coli* DH5α 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีข้ามคืน จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ มาใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตรนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์เจริญถึงช่วง log phase โดยจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.3 ถึง 0.4 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดเหวี่ยงที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 เท่าลงไป แล้วเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 20 นาที แยกคอมพิเทนต์เซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่า เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แบ่งคอมพิเทนต์เซลล์ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 210 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรอลลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

1.1.3.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมโดยวิธี heat shock

การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมทำตามวิธีการของ Sambrook *et al*. (1989) โดยใช้พลาสมิดความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อคอมพิเทนต์เซลล์ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติม LB ลงไป 800ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.4 การสกัดพลาสมิดลูกผสม pGKER จากเซลล์ที่โคลนได้

นำเซลล์โคโลนีเดี่ยวของเซลล์ลูกผสม *E. coli* DH5α (pGKER) จากหัวข้อ 1.1.3 มาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep® Spin miniprep kit ตามวิธีการสกัดในหัวข้อ 1.1.1

1.1.5 การตรวจสอบ พลาสมิดลูกผสม pGKER จากเซลล์ที่โคลนได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ วิธีการตัดดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากหัวข้อ 1.1.4 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำพีซีอาร์ โดยใช้สภาวะในหัวข้อ 1.1.2 แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส สำหรับการตัดพลาสมิดนั้นใช้ปริมาณพลาสมิด 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II พร้อมกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรรวมของการทำปฏิกิริยาเป็น 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นให้หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ตรวจสอบขนาดของยีนและพลาสมิดด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส แล้วทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราติเนสออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin Extract II® ก่อนแช่แข็งเก็บไว้สำหรับเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pFLAG-CTS ต่อไป

1.1.6 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและเฟรม (frame)

นำพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วจากหัวข้อ 1.1.5 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1-Base ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสและเฟรมของยีนเคราติเนส

1.1.7 การเชื่อมต่อยีนเคราติเนสเข้ากับ เวคเตอร์ pFLAG-CTS ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีน

เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราติเนส ที่ผ่านการตรวจสอบจากหัวข้อ 1.1.5 และ 1.1.6 เข้ากับพลาสมิด pFLAG-CTS ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

pFKER โดยใช้อัตราส่วนพลาสมิด 1:3 ดีเอ็นเอ ใช้ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 10X T4 ligase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อให้ปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วโคลนเข้าสู่ *E .coli* DH5α โดยวิธี heat shock ตามขั้นตอนในหัวข้อ 1.1.3.2

1.2 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pFKER จากเซลล์ลูกผสมในหัวข้อ 1.1.7

คัดเลือกโคลนที่มียีนเคราติเนสด้วยการนำพลาสมิด ลูกผสม จากแต่ ละ โคลนมาทำพีซีอาร์ และตรวจสอบขนาดของยีนโดยการตัดพลาสมิด ลูกผสม จากแต่ละโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามวิธีการในหัวข้อ 1.1.5 และการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและเฟรม ตามวิธีการในหัวข้อ 1.1.6

1.3 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pFKER เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออก

สำหรับพลาสมิดลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจากหัวข้อ 1.2 นำไปถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10 โดยทำตามวิธีการในหัวข้อ 1.1.3.2 จากนั้นเมื่อคัดเลือกโคลนได้แล้วก็ให้ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมตามวิธีการในหัวข้อ 1.1.5 ซ้ำอีกครั้ง ก่อนนำโคลนที่ได้ไป ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์

1.4 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์

ดัดแปลงจากวิธีตรวจสอบความสามารถในการย่อยขนไก่ (ขวัญคณิศร์, 2551: 29) โดยเลือกโคโลนีเซลล์ลูกผสม *E. coli* Rosetta (pFKER) และ *E. coli* TOP10 (pFKER) ที่ทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pFKER เข้าสู่เซลล์แล้ว นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 จึงทำการเติม isopropyl- beta-D-thiogalactoside (IPTG) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน และทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 1 ชั่วโมง ทำการเก็บทั้งหมด 24 ชั่งโมง แล้วทำการวิเคราะห์ โปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ (SDS-PAGE)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การแสดงออกของยีนเคราติเนสใน *Pichia pastoris* Y11430

ดัดแปลงวิธีการจากคู่มือ *Pichia* Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* (Invitrogen, 2010a)

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม

2.1.1 การเตรียมยีนเคราติเนสที่ไม่มีส่วนของ signal peptide โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบในหัวข้อ 1.1.1 และใช้วิธีการเดียวกับหัวข้อ 1.1.2 แต่เปลี่ยนไปใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1 จากนั้นทำ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ ที่บริสุทธิ์ ของยีนเคราติเนสเข้ากับพลาสมิด pTZ57R/T เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pTKER

2.1.2 การถ่ายโอน พลาสมิดลูกผสม pTKER เข้าสู่ *E. coli* DH5α (เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม) ใช้วิธีการเดียวกับหัวข้อ 1.1.3

2.1.3 การสกัดพลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ที่โคลนได้ ใช้วิธีการเดียวกับหัวข้อ 1.1.4

2.1.4 การตรวจสอบ พลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ที่โคลนได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ และวิธีการตัดดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I ใช้วิธีการเดียวกับหัวข้อ 1.1.5

2.1.5 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและเฟรม ใช้วิธีการ เดียวกับ หัวข้อ 1.1.6

2.1.6 การเชื่อมต่อยีนเคราติเนสเข้ากับ เวคเตอร์ pPICZα B เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pPKER สำหรับการแสดงออกของยีน นั้นใช้หลักการเดียวกับหัวข้อ 1.1.7 แต่เปลี่ยนอาหารที่ใช้คัดเลือกโคโลนีหลังจากการถ่ายโอน พลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* DH5α เป็น Low Salt LB ที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คัดเลือกโคลนที่มียีนเคราติเนสด้วยการนำพลาสมิดจากแต่ละโคลนมาทำพีซีอาร์ และตรวจสอบขนาดของยีนโดยการตัดพลาสมิดจากแต่ละ โคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามวิธีการในหัวข้อ 2.1.4 และการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและเฟรม ตามวิธีการในหัวข้อ 2.1.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การเตรียมเซลล์ *Pichia pastoris* Y11430 สำหรับ Electroporation

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยการถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร YPD จำนวน 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีข้ามคืน จากนั้นถ่ายเชื้อลงอาหาร YPD จำนวน 200 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิมจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ค่าอยู่ในช่วง 1.3-1.5 แล้วทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1500 g 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการละลายล้างเซลล์ด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการปั่นเก็บเซลล์แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์แล้วละลายเซลล์ใน 1 โมลาร์ sorbitol จำนวน 20 มิลลิลิตรที่ 0 องศาเซลเซียส ปั่นเก็บเซลล์แล้วละลายเซลล์ใน 1 โมลาร์ sorbitol จำนวน 1 มิลลิลิตรที่ 0 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ไว้บนน้ำแข็งและให้ใช้เซลล์ภายในวันที่เตรียมห้ามเก็บเซลล์ไว้ใช้ในวันถัดไป

2.3 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pPKER เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออก

สำหรับพลาสมิดลูกผสมที่ผ่านการตรวจสอบจากหัวข้อ 2.1.6 แล้วจึงนำไปถ่ายโอนเข้าสู่ *P. pastoris* Y11430 ด้วยวิธี Electroporation เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนเคราติเนส ดังนี้ นำเซลล์ *P. pastoris* Y11430 ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 2.2 จำนวน 80 ไมโครลิตร ผสมกับ พลาสมิดลูกผสม pPKER จำนวน 5-10 ไมโครลิตร โดยต้องทำการตัดพลาสมิดนี้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I ให้อยู่ในรูป linearized DNA ก่อน จากนั้นย้ายส่วนผสมนี้ลงสู่ electroporation cuvette ขนาด 0.2 เซนติเมตร ซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็ง และบ่มต่อไปเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการ Pulse เซลล์จำนวน 1 ครั้งโดยตั้งค่าแรงดันไฟฟ้าเท่ากับ 2 กิโลวัตต์ หลังจากนั้นเติม 1 โมลาร์ sorbitol ที่แช่บนน้ำแข็งจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงใน cuvette ทันที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ทั้งหมดลงสู่หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 1-2 ชั่วโมง ไม่ต้องเขย่า พอครบเวลานำสารละลายเซลล์ประมาณ 50-200 ไมโครลิตรไป spread plate บนอาหารแข็ง YPDS ที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วันจนกระทั่งเห็นโคโลนีเกิดขึ้น นำโคโลนีเดี่ยวจำนวน 10-20 โคโลนี ไป streak บนอาหารแข็ง YPD ที่มีความเข้มข้นของ Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเห็นโคโลนีเดี่ยวเกิดขึ้นให้นำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPD เพื่อสกัดโครโมโซมเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 การสกัดโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER)

ทำการเลี้ยงเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ในอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้งจากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม phenol chloroform isoamyl alcohol (25:24:1) ให้ปริมาตรเท่ากับ lysis buffer ที่ละลายตะกอนก่อนหน้า ผสมให้เข้ากันจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ประมาณ 300-350 ไมโครลิตร เติม 3 โมลาร์ sodium acetate buffer pH 5.2 จำนวน 40 ไมโครลิตร และเติม isopropanol 300-350 ไมโครลิตร ผสมโดยพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล แล้วปั่นเหวี่ยงจากนั้นทำตะกอนให้ แห้ง แล้วละลายในน้ำหรือ TE buffer pH 8.0 แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค พีซีอาร์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1 ตามวิธีการและสภาวะในหัวข้อ 1.1.2

2.5 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์

เลือกโคโลนีเดี่ยวของ เซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) มาเลี้ยงในอาหาร BMGY 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250-300 รอบต่อนาที จนวัดค่า OD_{600} ได้อยู่ในช่วง 2-6 จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 1500-3000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนที่ได้มาละลายในอาหาร BMMY จนได้ค่า OD_{600} ประมาณ 1.0 และทำการเติม methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เติมอีกทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาระดับการแสดงออก จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อตามช่วงเวลาดังนี้ 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง และสำหรับตัวอย่างที่เก็บมาแล้วนั้นสามารถปั่นเหวี่ยงแยกเก็บ น้ำเลี้ยงเซลล์และตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การวิเคราะห์

3.1 การเตรียมเอนไซม์ลูกผสมจากส่วนต่างๆ

ดัดแปลงจากวิธีการของ Escarlata *et al*. (2010) โดยนำเซลล์ลูกผสม *E. coli* Rosetta (pFKER) และ *E. coli* TOP10 (pFKER) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก ของยีนเพื่อผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ที่เก็บได้นั้นมาปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกน้ำเลี้ยงเซลล์ (the crude culture supernatant) กับตัวเซลล์ (the cell pellet) ออกจากกัน ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เอาไว้วิเคราะห์ต่อ ไป ส่วนตัวเซลล์ ให้นำมาละลายในบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.4, 5 เปอร์เซ็นต์ glycerol, 50 มิลลิโมลาร์ NaCl) จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้น ทำให้เซลล์แตกด้วย วิธีแช่แข็งและละลาย (Freeze and Thaw Lysis) โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสแล้วทำการละลาย เป็น จำนวนทั้งสิ้น 5 รอบ แล้วเติมเอนไซม์ DNase (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องพ ร้อมกับเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10-20 นาที เมื่อบ่มครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยง 16,000 g 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก (the pellet of cell lysate) กับส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก (the supernatant of cell lysate) ออกจากกัน หากยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ให้เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ส่วนการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี อิเล็กโทรโฟริซีสแบบเอสดีเอส-เพจ ให้นำเอาตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนที่แยกได้มาผสมกับ sample buffer ในหลอดทดลองดังนี้ ตัวอย่างส่วน ตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ผสมกับ 100 ไมโครลิตรของ 1X sample buffer สำหรับส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์และส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตกให้ผสมกับ 5X sample buffer จนได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 1X sample buffer แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที พอตัวอย่างเย็นลง จึงนำตัวอย่างไปหยอด ลงในช่องใส่ตัวอย่าง บนแผ่นเจลประมาณ 10-20 ไมโครลิตร ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข ข้อที่ 4

3.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน ถ่ายไปยังอาหาร สคิมมิลค์อะการ์ (skim milk agar) ที่มีแอมพิซิลลิน และ IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ดังกล่าว โดยพิจารณาจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry *et al*. (1951) โดยการวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์ ในการทดลองนี้ใช้เคซีน 1.2 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 เป็นสับสเตรท จากนั้นนำมา 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีความเจือจางเหมาะสม จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.44 โมลาร์ trichloroacetic acid จำนวน 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ตกตะกอนสมบูรณ์ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณไทโรซีนด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Ferrero *et al*. (1996) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข ข้อที่ 1

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 10 นาที ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์

3.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Lin *et al*. (1992) โดยใช้ขนไก่บดเป็นสับสเตรท ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย ขนไก่บดขนาด 0.5 มิลลิเมตร 5 มิลลิกรัม สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์เคราติเนสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 0.2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสไปหาปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมาเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี Ninhydrin (Rosen, 1957) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข ข้อที่ 2

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทจนทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 60 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และมวลโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทร โฟริซิส แบบเอสดีเอส-เพจ (SDS–PAGE)

ใช้อุปกรณ์ Minigel electrophoresis unit (Mu-Pid2) ของบริษัท Bio-Rad โดยใช้วิธีการของ Laemmli (1970) แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข ข้อที่ 4 ใช้สี Coomassie brilliant blue R-250 ในการย้อมเจล หรือย้อมเจลด้วย silver stain plus kit (Bio-Rad, USA) ตามความเหมะสม และใช้ 10-250 kDa Protein Ladder ของบริษัท Fermentas เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.6 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยขนไก่ของเซลล์ยีสต์ลูกผสม

นำโคโลนีเดี่ยวของ เซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ที่มีความสามารถในการย่อยเคซีนบนอาหารสคิมมิลค์อะการ์ได้ มาเลี้ยงในอาหาร BMGY 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 300 รอบต่อนาที จนวัดค่า OD_{600} ได้อยู่ในช่วง 2-6 จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 1500-3000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนที่ได้มาละลายในอาหาร BMMY ที่มีขนไก่อยู่จนได้ค่า OD_{600} ประมาณ 1.0 และทำการเติม methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เติมอีกทุกๆ 24 ชั่วโมงเพื่อรักษาระดับการแสดงออก ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเลี้ยงครบ 14 วัน ทำการปั่นแยกเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 8000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำเลี้ยงเซลล์เก็บแช่แข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสและค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป จากนั้นให้แยกขนไก่ออกมาตรวจสอบลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ผลการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน *Escherichia coli* TOP10 และ *Escherichia coli* Rosetta

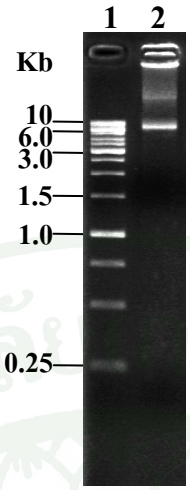
1.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA)

สามารถสกัดพลาสมิดลูกผสม pGKER51 จากเชื้อ *E. coli* DH5α (pGKER51) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ได้ โดยหลังจากการ ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม pGKER51 (ภาพที่ 6) มีลักษณะสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอไม่ถูกทำลายพร้อมนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การเตรียมยีนเคราติเนส

การเพิ่มปริมาณ ยีนเคราติเนส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนเคราติเนสจากดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน เคราติเนส คือ FKER และ RKER และตรวจสอบขนาดและปริมาณของ พีซีอาร์โปรดักส์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1093 คู่เบส (ภาพที่ 7) ตามที่คาดหวังไว้ แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน เคราติเนสนี้มีความจำเพาะเจาะจง สูง สังเกตได้จากความเข้มและหนาแน่นของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1093 คู่เบส ที่พบเพียงแถบเดียวและไม่มีแถบที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น ในขั้นต่อไปของการโคลนยีนนั้นจะต้องทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอ ของยีนเคราติเนสออก จากเจลไปแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้ ชุดสกัด NucleoSpin extract II® (Machere-Nagel, USA) ก่อนที่จะนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector

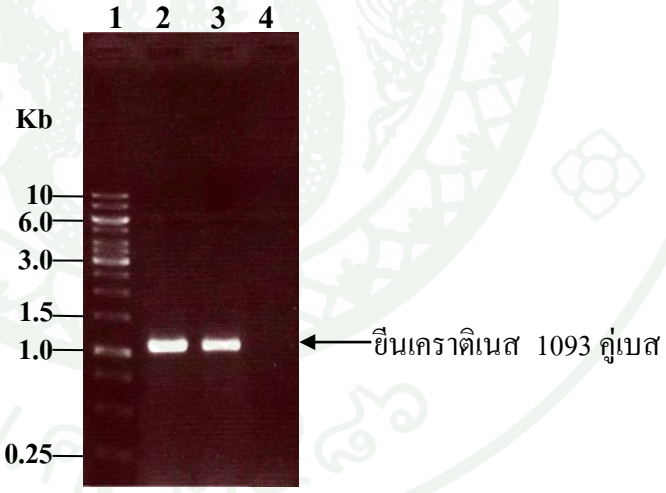
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีนเคราติเนส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิดลูกผสม pGKER51 ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ



ภาพที่ 7 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 4 negative control

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

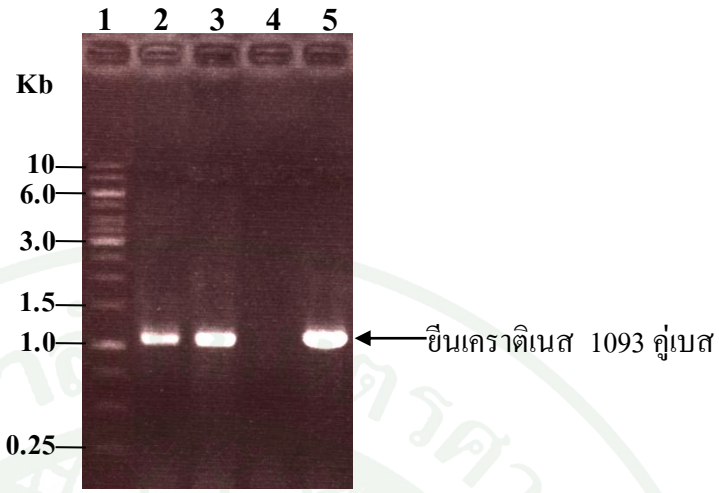
1.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ ใน *Escherichia coli* DH5α

นำชิ้นยีนที่สังเคราะห์ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T easy vector เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pGKER จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* DH5α การเชื่อมต่อยีนเข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector จะช่วยเพิ่มพื้นที่ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจับกับตำแหน่งจดจำในการตัดได้ดียิ่งขึ้น หลังจากได้โคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว จึงสกัดเอาพลาสมิดลูกผสม pGKER มาตรวจสอบโดยวิธีพีซีอาร์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ FKER และ RKER หลังจากตรวจสอบพีซีอาร์โปรดักส์จากเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1093 คู่เบส (ภาพที่ 8) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสม pGKER มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดและยีนเคราติเนสที่ต้องการด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3015 คู่เบส และ 1093 คู่เบส (ภาพที่ 9) แสดงว่าพลาสมิดลูกผสม pGKER มียีนเคราติเนสเชื่อมต่ออยู่จริง

1.4 การตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เคราติเนส (DNA sequencing)

สกัดพลาสมิดลูกผสม pGKER ซึ่งเชื่อมต่อกับยีนเคราติเนสจากโคโลนีแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จึงส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1-Base ประเทศมาเลเซีย วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเคราติเนสที่ขวัญคณิศร์ (2551) ได้รายงานไว้ก่อนหน้าโดยใช้โปรแกรม ClustalW 2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเคราติเนสที่ไม่มีส่วน signal peptide ที่นำมาเปรียบเทียบ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (แถบสีฟ้า) *Kpn*I และ *Bgl*II เชื่อมต่อเข้ากับยีนเคราติเนสได้ถูกต้องตรงตามเฟรมในการแปลรหัสเป็นโปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



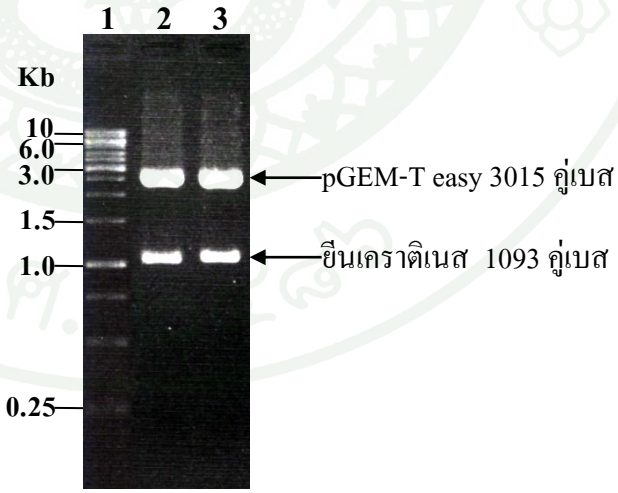
ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pGKER ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 และ 3 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 4 negative control

ช่องที่ 5 positive control



ภาพที่ 9 ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pGKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 และ 3 พลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bgl*II

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1     GGTACCTCTGCTGCTCAGCCGGCGAAAAATGTTGAAAAGGATTATATTGTCGGATTTAAG   60
      G  T  S  A  A  Q  P  A  K  N  V  E  K  D  Y  I  V  G  F  K
61    TCAGGAGTGAAAACCGCATCCGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAGAGCGGCGGAAAAGTG  120
      S  G  V  K  T  A  S  V  K  K  D  I  I  K  E  S  G  G  K  V
121   GACAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCGGCAAAAGCGAAGCTAGACAAAGAAGCGCTTAAG  180
      D  K  Q  F  R  I  I  N  A  A  K  A  K  L  D  K  E  A  L  K
181   GAAGTCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTATGTGGAAGAGGATCATGTGGCCCATGCCTTG  240
      E  V  K  N  D  P  D  V  A  Y  V  E  E  D  H  V  A  H  A  L
241   GCGCAAACCGTTCCTTACGGCATTCCTCTCATTAAAGCGGACAAAGTGCAGGCTCAAGGC  300
      A  Q  T  V  P  Y  G  I  P  L  I  K  A  D  K  V  Q  A  Q  G
301   TTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGCCGTCCTGGATACAGGAATCCAAGCTTCTCATCCG  360
      F  K  G  A  N  V  K  V  A  V  L  D  T  G  I  Q  A  S  H  P
361   GACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACCGACGGC  420
      D  L  N  V  V  G  G  A  S  F  V  A  G  E  A  Y  N  T  D  G
421   AACGGACACGGCACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGCGCTTGACAATACAACGGGTGTA  480
      N  G  H  G  T  H  V  A  G  T  V  A  A  L  D  N  T  T  G  V
481   TTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGGTTAAAGTACTGAATTCAAGCGGAAGC  540
      L  G  V  A  P  S  V  S  L  Y  A  V  K  V  L  N  S  S  G  S
541   GGATCATACAGCGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACAAACGGCATGGATGTT  600
      G  S  Y  S  G  I  V  S  G  I  E  W  A  T  T  N  G  M  D  V
601   ATCAATATGAGCCTTGGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGATGAAACAGGCAGTCGACAAT  660
      I  N  M  S  L  G  G  A  S  G  S  T  A  M  K  Q  A  V  D  N
661   GCATATGCAAGAGGGGTTGTCGTTGTAGCTGCAGCAGGGAACAGCGGATCTTCAGGAAAC  720
      A  Y  A  R  G  V  V  V  V  A  A  A  G  N  S  G  S  S  G  N
721   ACGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGATTCTGTCATCGCTGTTGGTGCGGTAGAC  780
      T  N  T  I  G  Y  P  A  K  Y  D  S  V  I  A  V  G  A  V  D
781   TCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCTCCT  840
      S  N  S  N  R  A  S  F  S  S  V  G  A  E  L  E  V  M  A  P
841   GGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTATGCAACATTGAACGGAACGTCA  900
      G  A  G  V  Y  S  T  Y  P  T  N  T  Y  A  T  L  N  G  T  S
901   ATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGTCAAAACATCCGAACCTT  960
      M  A  S  P  H  V  A  G  A  A  A  L  I  L  S  K  H  P  N  L
961   TCAGCTTCACAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTATTTGGGAAGCTCCTTC  1020
      S  A  S  Q  V  R  N  R  L  S  S  T  A  T  Y  L  G  S  S  F
1021  TACTATGGGAAAGGTCTGATCAATGTCGAAGCTGCCGCTCAACATCATCATCATCATCAT  1080
      Y  Y  G  K  G  L  I  N  V  E  A  A  A  Q  H  H  H  H  H  H
1081  TAAAGATCT  1089
      *  R  S
```

ภาพที่ 10 ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pGKER

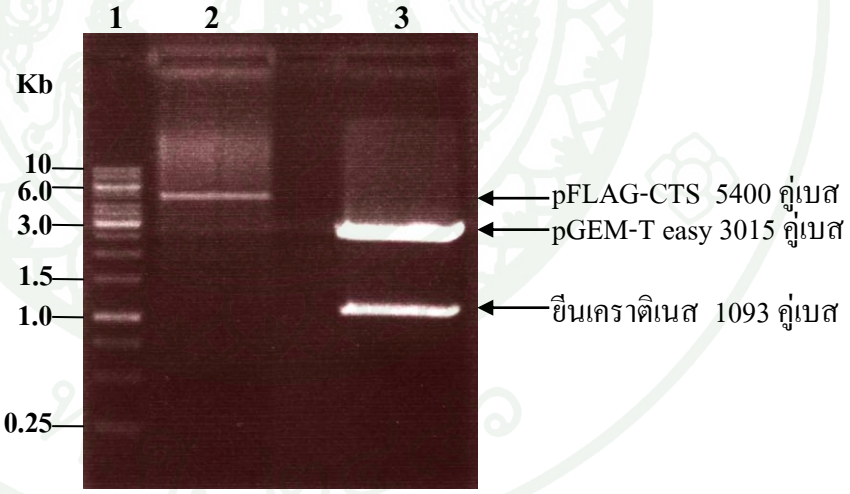
แถบสีฟ้า คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bgl*II ตามลำดับ

แถบสีแดง คือ stop codon

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.5 การ subclone ที่มียีนเคราติเนสเข้าสู่เวกเตอร์ expression vector

นำโคลนที่ผ่านการ วิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ จากหัวข้อ 1.1.6 มาทำการตัดยีนเคราติเนสออกจากพลาสมิดลูกผสม pGKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (Double digestion) คือ *Kpn*I และ *Bgl*II ในขณะเดียวกันก็ทำการตัดเวกเตอร์ pFLAG-CTS expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทั้ง 2 ชนิดเช่นเดียวกัน เพื่อต้องการให้มีตำแหน่งจดจำบนดีเอ็นเอที่แน่นอน และเข้าเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ในตำแหน่งจดจำเดียวกัน ซึ่งจะทำให้ยีนเคราติเนสและเวคเตอร์ pFLAG-CTS expression vector นั้นเชื่อมต่อกันอย่างถูกต้อง นอกจากนี้พบว่าหลังจาก ตัดพลาสมิดและเวคเตอร์ด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ 2 ชนิด แล้วทำการวิเคราะห์ขนาด และปริมาณของดีเอ็ นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1093 คู่เบส 3015 คู่เบส และ 5400 คู่เบส ซึ่งก็คือยีนเคราติเนส (ภาพที่ 11 ช่องที่ 3) พลาสมิด pGEM-T easy vector (ภาพที่ 11ช่องที่ 3) และพลาสมิด pFLAG-CTS expression vector (ภาพที่ 11 ช่องที่ 2) ตามลำดับ



ภาพที่ 11 การตัดพลาสมิดลูกผสม pGKER และการตัดพลาสมิด pFLAG-CTS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

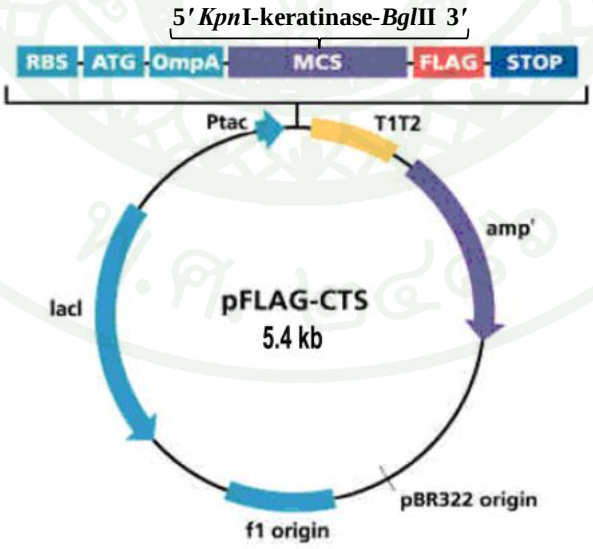
ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pFLAG-CTS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

ช่องที่ 3 จากพลาสมิดลูกผสม pGKER ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

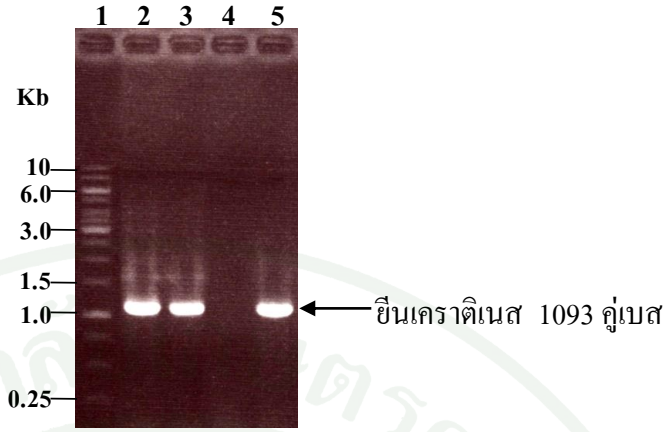
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ของยีน เคราติเนสมาเชื่อม ต่อกับเวกเตอร์ pFLAG- CTS ในตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II (ภาพที่ 12) ทำให้ได้พลาสมิดลูกผสม pFKER จากนั้นนำไปถ่ายทอดเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock ในหัวข้อ 1.1.3 แล้วทำคัดเลือกโคโลนี ที่เจริญบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีโคโลนีปรากฏขึ้นบน อาหารคัดเลือกมาก กว่า 300 โคโลนี จึงสุ่มมาสกัดพลาสมิดลูกผสม ด้วย QIAprep® Spin Miniprep kit และนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1093 คู่เบส (ภาพที่ 13) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอภายในพลาสมิด ลูกผสม โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II พบว่าพลาสมิดลูกผสม ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบแถบดีเอ็นเอสองขนาด คือ 5398 คู่เบสของพลาสมิด pFLAG-CTS และแถบดีเอ็นเอขนาด 1093 คู่เบสของยีนเคราติเนส (ภาพที่ 14) แล้วนำพลาสมิดลูกผสม ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1-Base ประเทศมาเลเซีย พบว่ายีนเคราติเนสถูกเชื่อมต่อกับตำแหน่งของ *omp*A signal peptide บนพลาสมิด pFLAG-CTS ที่ตำแหน่ง *Kpn*I ได้ถูกต้องตามเฟรมการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (ภาพที่ 15) และลำดับเบสของยีนเคราติเนสภายในพลาสมิด ลูกผสมไม่มีความแตกต่างไป จากลำดับเบสของยีนเคราติเนสที่ ทำการวิเคราะห์มาก่อน หน้า จึงถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่ *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10



ภาพที่ 12 การเชื่อมต่อระหว่างยีนเคราติเนสกับพลาสมิด pFLAG-CTS ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



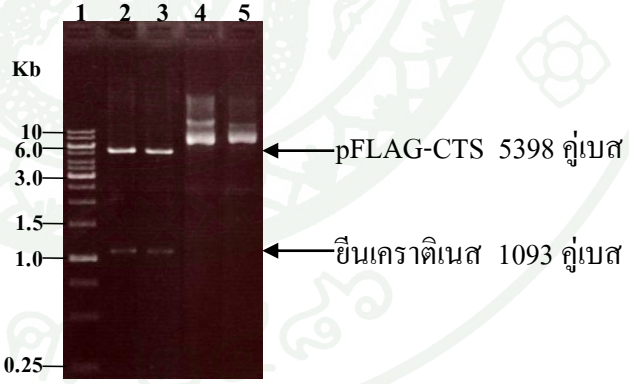
ภาพที่ 13 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER ที่ใช้พลาสมิดลูกผสม pFKER เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 และ 3 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 4 negative control

ช่องที่ 5 positive control



ภาพที่ 14 การตัดพลาสมิดลูกผสม pFKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 และ 3 พลาสมิดลูกผสม pFKER ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bgl*II

ช่องที่ 4 และ 5 พลาสมิดลูกผสม pFKER ที่ไม่ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bgl*II

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1     ACCGTTGCGCAAGCTTCGCTCGAGGAATTCGGATCCGGTACCTCTGCTGCTCAGCCGGCG   60
      T  V  A  Q  A  S  L  E  E  F  G  S  G  T  S  A  A  Q  P  A
61    AAAAATGTTGAAAAGGATTATATTGTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCCGTC  120
      K  N  V  E  K  D  Y  I  V  G  F  K  S  G  V  K  T  A  S  V
121   AAAAAGGACATCATCAAAGAGAGCGGCGGAAAAGTGGACAAGCAGTTTAGAATCATCAAC  180
      K  K  D  I  I  K  E  S  G  G  K  V  D  K  Q  F  R  I  I  N
181   GCGGCAAAAGCGAAGCTAGACAAAGAAGCGCTTAAGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGTC  240
      A  A  K  A  K  L  D  K  E  A  L  K  E  V  K  N  D  P  D  V
241   GCTTATGTGGAAGAGGATCATGTGGCCCATGCCTTGGCGCAAACCGTTCCTTACGGCATT  300
      A  Y  V  E  E  D  H  V  A  H  A  L  A  Q  T  V  P  Y  G  I
301   CCTCTCATTAAAGCGGACAAAGTGCAGGCTCAAGGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTA  360
      P  L  I  K  A  D  K  V  Q  A  Q  G  F  K  G  A  N  V  K  V
361   GCCGTCCTGGATACAGGAATCCAAGCTTCTCATCCGGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCA  420
      A  V  L  D  T  G  I  Q  A  S  H  P  D  L  N  V  V  G  G  A
421   AGCTTTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACCGACGGCAACGGACACGGCACACATGTTGCC  480
      S  F  V  A  G  E  A  Y  N  T  D  G  N  G  H  G  T  H  V  A
481   GGTACAGTAGCTGCGCTTGACAATACAACGGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCC  540
      G  T  V  A  A  L  D  N  T  T  G  V  L  G  V  A  P  S  V  S
541   TTGTACGCGGTTAAAGTACTGAATTCAAGCGGAAGCGGATCATACAGCGGCATTGTAAGC  600
      L  Y  A  V  K  V  L  N  S  S  G  S  G  S  Y  S  G  I  V  S
601   GGAATCGAGTGGGCGACAACAAACGGCATGGATGTTATCAATATGAGCCTTGGGGGAGCA  660
      G  I  E  W  A  T  T  N  G  M  D  V  I  N  M  S  L  G  G  A
661   TCAGGCTCGACAGCGATGAAACAGGCAGTCGACAATGCATATGCAAGAGGGGTTGTCGTT  720
      S  G  S  T  A  M  K  Q  A  V  D  N  A  Y  A  R  G  V  V  V
721   GTAGCTGCAGCAGGGAACAGCGGATCTTCAGGAAACACGAATACAATTGGCTATCCTGCG  780
      V  A  A  A  G  N  S  G  S  S  G  N  T  N  T  I  G  Y  P  A
781   AAATACGATTCTGTCATCGCTGTTGGTGCGGTAGACTCTAACAGCAACAGAGCTTCATTT  840
      K  Y  D  S  V  I  A  V  G  A  V  D  S  N  S  N  R  A  S  F
841   TCCAGTGTGGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTAC  900
      S  S  V  G  A  E  L  E  V  M  A  P  G  A  G  V  Y  S  T  Y
901   CCAACGAACACTTATGCAACATTGAACGGAACGTCAATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGA  960
      P  T  N  T  Y  A  T  L  N  G  T  S  M  A  S  P  H  V  A  G
961   GCAGCAGCTTTGATCTTGTCAAAACATCCGAACCTTTCAGCTTCACAAGTCCGCAACCGT  1020
      A  A  A  L  I  L  S  K  H  P  N  L  S  A  S  Q  V  R  N  R
1021  CTCTCCAGCACGGCGACTTATTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAGGTCTGATCAAT  1080
      L  S  S  T  A  T  Y  L  G  S  S  F  Y  Y  G  K  G  L  I  N
1081  GTCGAAGCTGCCGCTCAACATCATCATCATCATCATTAAAGATCT  1125
      V  E  A  A  A  Q  H  H  H  H  H  H  *  R  S
```

ภาพที่ 15 ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pFKER

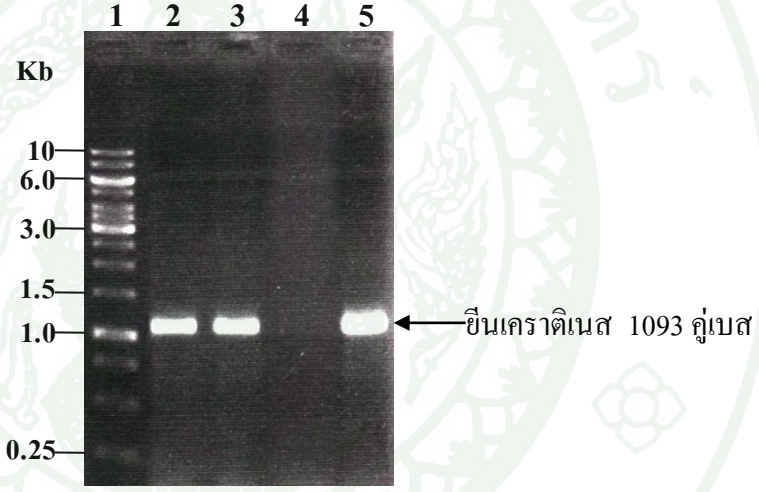
แถบสีฟ้าเหลือง คือ ตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับ signal peptide บนพลาสมิด pFKER

แถบสีฟ้า คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Kpn*I และ *Bgl*II ตามลำดับ

แถบสีแดง คือ stop codon

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อถ่ายโอนพลาสมิด ลูกผสม pFKER เข้าสู่ *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10 จากนั้นคัดเลือกโคโลนีของเซลล์ลูกผสม *E. coli* Rosetta (pFKER) และ *E. coli* TOP10 (pFKER) ที่เจริญบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรมา เลี้ยงเพิ่มจำนวน แล้วจึง สกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบ การมีอยู่ของ ยีนเคราติเนส ในพลาสมิดลูกผสม โดยการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ FKER และ RKER พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1093 คู่เบส (ภาพที่ 16) ซึ่งเป็นขนาดของยีนเคราติเนส และนำพลาสมิดลูกผสมตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II พบแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 5398 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของพลาสมิด pFLAG-CTS และแถบดีเอ็นเอขนาด 1093 คู่เบส (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นขนาดของยีนเคราติเนสเช่นเดียวกันกับผลที่ได้ทำการวิเคราะห์ก่อนหน้า ดังนั้นจึงนำเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 ชนิดไปทดสอบการผลิตโปรตีนตามวิธีการในหัวข้อ 1.4



ภาพที่ 16 การตรวจสอบยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pFKER จากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FKER และ RKER

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

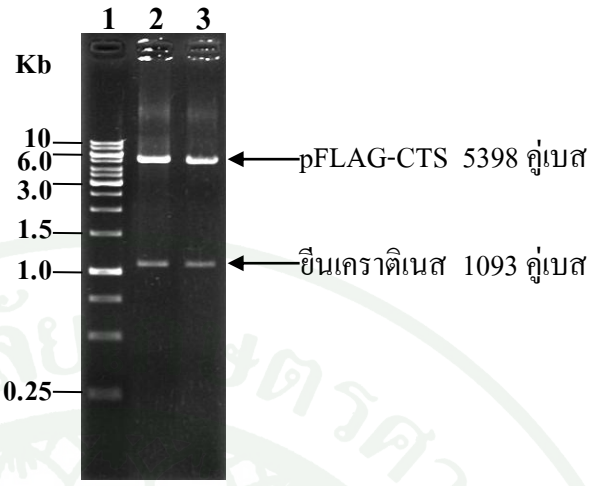
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจาก *E. coli* Rosetta (pFKER)

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดจาก *E. coli* TOP10 (pFKER)

ช่องที่ 4 negative control

ช่องที่ 5 positive control

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 การตัดพลาสมิดลูกผสม pFKER จากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิดลูกผสม pFKER จาก *E. coli* Rosetta (pFKER) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

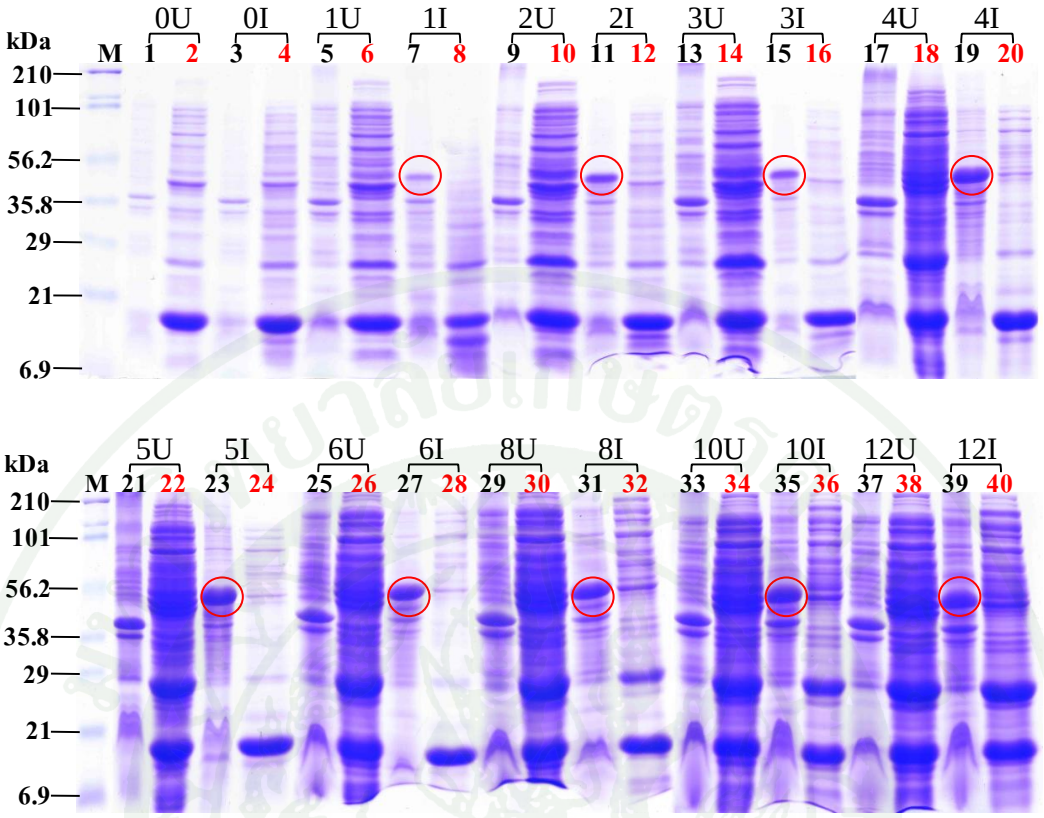
ช่องที่ 3 พลาสมิดลูกผสม pFKER จาก *E. coli* TOP10 (pFKER) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Bgl*II

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.6 การตรวจสอบโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER) และ *Escherichia coli* TOP10 (pFKER)

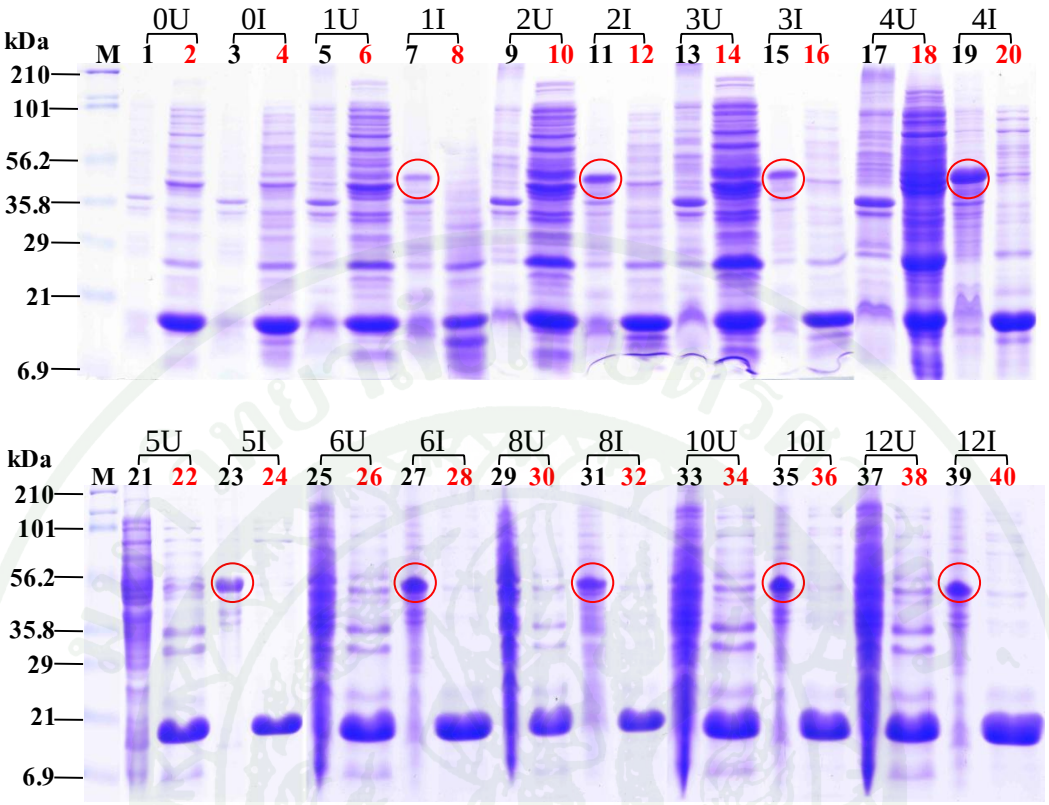
นำเซลล์ลูกผสม *E. coli* Rosetta (pFKER) และ *E. coli* TOP10 (pFKER) ที่คัดเลือกได้ไปทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร สคิมมิลค์อะการ์ ซึ่งหากมีการผลิตเอนไซม์ออกนอกเซล ล์ควรจะเห็นวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร เพราะเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 จัดอยู่ใ นกลุ่ม serine protease (สุดาทิพย์, 2546) แสดงการย่อยเคซีนในอาหารสคิมมิลค์อะการ์ ได้ (สุทธิพันธุ์, 2540) และจากการตรวจสอบ น้ำเลี้ยงเซ ลล์ด้วยวิธีอิเล็กโทร โฟริซิสแบบเอสดีเอส- เพจ ก็ไม่พบแถบ โปรตีนที่คาดหมาย ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เคราติเนสที่ผลิตขึ้นอาจถูกเ ก็บอยู่ภายในเซลล์ จึงทำการเตรียมเอนไซม์ลูกผสมจากส่วนต่างๆตามวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ 3.1 ทำให้ได้เอนไซม์ออกมา 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์ (the crude culture supernatant) ส่วนที่ 2 คือ ส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก (the supernatant of cell lysate) และส่วนที่ 3 คือ ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก (the pellet of cell lysate) จากนั้นนำเอนไซม์ทั้ง 3 ส่วนนี้ไปทดสอบหยดบนอาหาร สคิมมิลค์อะการ์ที่ได้เจาะรูเอาไว้ก็ไม่พบวงใสบนอาหาร จึงนำ ส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก และส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ไปวิเคราะห์โดยวิธี อิเล็กโทร โฟริซิสแบบเอสดีเอส- เพจ โดยคาดหวังว่าหากมีการแสดงออกของยีนเคราติเนสควรจะพบแถบโปรตีนขนาด 36.6 กิโลดาลตัน (ขนาดโปรตีนที่คำนวณโดยโปรแกรม GENETYX) จากตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ แต่กลับพบแถบโปรตีนขนาด 54 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 18 และ 19) จากตัวอย่างส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ของเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เมื่อเวลาของการเหนี่ยวนำเพิ่มขึ้นแถบโปรตีนที่พบจะเข้มและหนาแน่นขึ้น ซึ่งเริ่มเห็นอย่างชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการแสดง ออกของยีน ด้วย IPTG ซึ่งจะไม่พบแถบโปรตีนนี้จากตัวอย่างที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG จึงทำให้คาดได้ว่าแถบโปรตีนขนาด 54 กิโลดาลตันเป็นแถบโปรตีนที่ มาจากยีนเคราติเนส (Inserted gene) ซึ่งขนาดของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากการที่โปรตีนผลิตออกมาใน ส่วนตะกอนหลัง จากทำให้เซลล์แตก ซึ่งอนุภาคของโปรตีนส่วนนี้ยังประกอบไปด้วยโปรตีนที่เซลล์เจ้าบ้านผลิตขึ้นเองจำนวนหนึ่งซึ่งมีอยู่น้อยและส่วนประกอบของ ribosomal หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (Rinas and Baily , 1992; Valax and Georgiou , 1993) และการที่โปรตีนไม่ถูกขับออ กภายนอกเซลล์ดังนั้นโปรตีนอาจมีส่วน *omp*A signal peptide ที่ได้รับมาจากพลาสมิดลูกผสม pFKER รวมอยู่ด้วยจึงทำให้พบแถบโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีขนาดเพิ่มขึ้นจากขนาดที่คำนวณได้ด้วยโปรแกรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 การตรวจสอบโปรตีนในส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตกและในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก จากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER) ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Bio-Rad, USA), 1-39 (ตัวอักษรเลขคี่สีดำ) คือ โปรตีนจากส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก, 2-40 (ตัวอักษรเลขคู่สีแดง) คือ โปรตีนจากส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก , 0U-12U คือ โปรตีนจากสภาวะการเลี้ยงที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เก็บตามช่วงเวลาต่างๆ , 0I-12I คือ โปรตีนจากสภาวะการเลี้ยงที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เก็บตามช่วงเวลาต่างๆ , วงกลมสีแดง คือ แถบโปรตีนขนาด 54 กิโลดาลตัน ที่พบใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วย IPTG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 การตรวจสอบโปรตีนในส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตกและในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก จากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* TOP10 (pFKER) ที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส - เพจ โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Bio-Rad, USA), 1-39 (ตัวอักษรเลขคี่สีดำ) คือ โปรตีนจากส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก, 2-40 (ตัวอักษรเลขคู่สีแดง) คือ โปรตีนจากส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก , 0U-12U คือ โปรตีนจากสภาวะการเลี้ยงที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เก็บตามช่วงเวลาต่างๆ , 0I-12I คือ โปรตีนจากสภาวะการเลี้ยงที่เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เก็บตามช่วงเวลาต่างๆ , วงกลมสีแดง คือ แถบโปรตีน ขนาด 54 กิโลดาลตัน ที่พบใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก หลังจากเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วย IPTG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

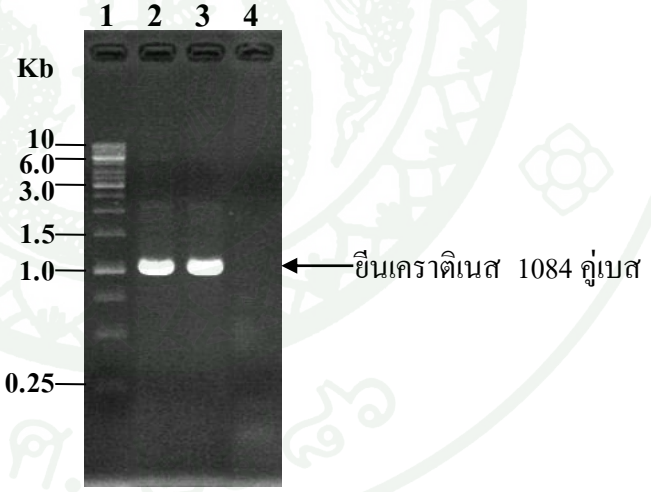
ดังนั้นแสดงว่ายีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 แสดงออกในระบบ *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10 ได้ โดยใช้เวคเตอร์ pFLAG-CTS สำหรับการแสดงออกและเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG แต่โปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ไม่ถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งต่างจากการทดลองของ Yamabhai *et al*. (2008) ที่ใช้เวคเตอร์ pFLAG-CTS สำหรับการแสดงออกของยีนแอลฟา-อะมิเลส แมนนาเนส และไคติเนส ที่เหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* TOP10 สามารถผลิตโปรตีนและขับออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ ถึงแม้ว่าระบบการแสดงออกจะเป็นระบบเดียวกันแต่โปรตีนที่แสดงออกเป็นคนละชนิดกัน ลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติของโปรตีนที่แสดงออกจึงไม่เหมือนกัน ด้วยเหตุผลนี้ในบางครั้งจะแสดงแนวโน้มที่ก่อให้เกิดโปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก (Violand *et al*., 2001) ทำให้โปรตีนไม่ถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์ เนื่องจากโปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกเกิดจากการรวมกลุ่มกันของโพลีเปปไทด์ที่เกิดการม้วนพับไม่สมบูรณ์ ไม่ละลายน้ำ สะสมและกระจายตัวอยู่ในไซโทพลาสซึม (Williams *et al*., 1982; Schoner *et al*., 1985; Krueger *et al*., 1989; Hockney, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ โปรตีนลูกผสมด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส -เพจ พบแถบโปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก แต่ไม่พบแถบโปรตีนจากส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ และส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก นอกจากนั้นการที่เป็นโปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก เมื่อนำส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ และส่วนใสหลังจากทำให้เซลล์แตก ไปทดสอบบนอาหารสคิมมิลค์อะการ์จึงไม่พบวงใสบนอาหาร แต่สำหรับโปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ที่ไม่พบวงใสบนอาหารสคิมมิลค์อะการ์ อาจเป็นเพราะ โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเนื่องจากถูก reducing จากสภาวะแวดล้อมภายใน cytoplasm ของเซลล์ *E. coli* (Tuggle and Fuchs, 1985) โปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ใน *E. coli* จะถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนในระดับที่สูง (Marston , 2009 ; Kane and Hartley , 1988) ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ inducible plasmid สำหรับการแสดงออกของยีนใน *E. coli* ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโปรตีนใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก [ในการศึกษาทางด้าน Metagenomic สามารถแยกยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในกลุ่ม alkaline serine protease ได้จากบริเวณพื้นผิวของขนแกะ จึงทำการโคลนยีนนี้เข้าสู่เวคเตอร์ pET30b เพื่อให้ยีนแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3) แต่พบว่าหลังจากการเหนี่ยวนำการแสดงออก พบว่าโปรตี นถูกแสดงออกใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก (Pushpam, 2011) นอกจากนั้นได้มี การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน keratinase– streptavidin fusion protein ในระบบ *B. subtilis* และ *E. coli* พบว่าระบบ *B. subtilis* สามารถผลิต fusion protein ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ระบบ *E. coli* ผลิต fusion protein ในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก (Wang, 2003)]

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน *Pichia Pastoris* Y11430

2.1 การเตรียมยีนเคราติเนส

การเพิ่มปริมาณยีนเคราติเนส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1 ที่จำเพาะกับยีน เคราติเนส พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน เคราติเนสจากดีเอ็นเอแม่แบบ (คือ พลาสมิด ลูกผสม pGKER51) โดยตรวจสอบขนาดและปริมาณของ พีซีอาร์โปรดักส์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรส เจล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1084 คู่เบส (ภาพที่ 20) ซึ่งเป็นขนาดของยีนเคราติเนสตามที่คาดหมายไว้ แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน เคราติเนสนี้มีความจำเพาะเจาะจง สูงในการเพิ่มจำนวนยีนเคราติเนส สังเกตได้จากความเข้ม และหนาแน่นของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1084 คู่เบส ที่พบเพียงแถบเดียว



ภาพที่ 20 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 4 negative control

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

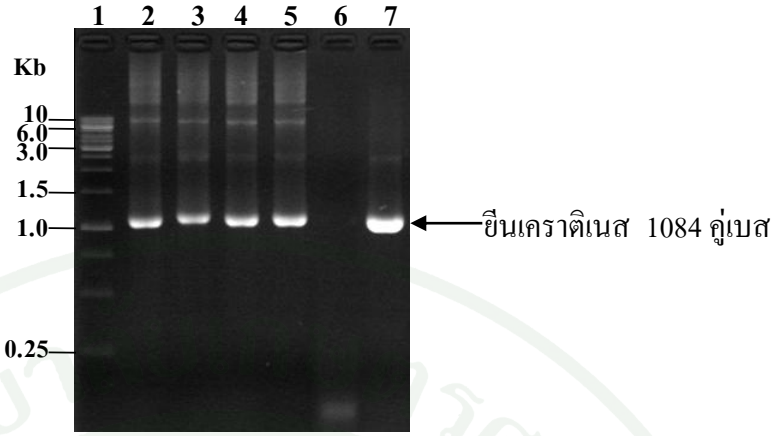
2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ ใน *Escherichia coli* DH5α

ทำการตัด ชิ้นยีนที่สังเคราะห์ได้ ออกจากเจล ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ ชุดสกัด NucleoSpin extract II® นำชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T cloning vector เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pTKER จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมนี้ เข้าสู่ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสมให้ได้ปริมาณมาก และการที่ยีนเคราติเนส เชื่อมต่อเข้า กับพลาสมิด pTZ57R/T ยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจับกับตำแหน่งจดจำในการตัด ได้ดียิ่งขึ้น หลังจากได้โคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจึงสกัดพลาสมิดลูกผสม pTKER มาตรวจสอบโดยการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ FPIC 1 และ RPIC 1 ทำการวิเคราะห์พีซีอาร์โปรดักส์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1084 คู่เบส (ภาพที่ 21) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสม pTKER มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดและยีนเคราติเนสที่ต้องการ หลังจากตรวจสอบด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2886 คู่เบสของพลาสมิด pTZ57R/T และ 1084 คู่เบสของยีนเคราติเนส (ภาพที่ 22) แสดงว่าพลาสมิดลูกผสม pTKER มียีนเคราติเนสเชื่อมต่ออยู่จริง

2.3 ศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เคราติเนส (DNA sequencing)

หลังจากที่สกัดพลาสมิดลูกผสม pTKER จากโคโลนีแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จึงส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1-Base ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นนำผลการวิคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เคราติเนส ที่ขวัญคณิศร์ (2551) ได้รายงานไว้ก่อนหน้าโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนมีความเหมือน นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เคราติเนส ที่ไม่มีส่วน signal peptide ที่นำมาเปรียบเทียบ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผล การตรวจสอบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 23) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (แถบสีฟ้า) *Kpn*I และ *Xba*I เชื่อมต่อกับยีนเคราติเนส ได้ถูกต้องตรงตามเฟรมในการแปลรหัสเป็นโปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



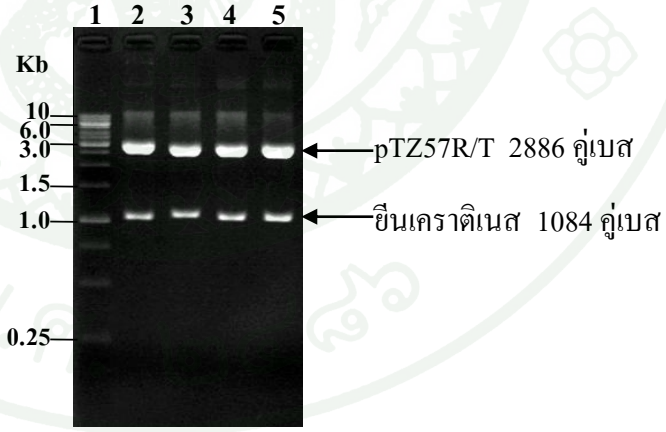
ภาพที่ 21 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pTKER ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 - 5 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 6 negative control

ช่องที่ 7 positive control



ภาพที่ 22 ผลการตัดพลาสมิดลูกผสม pTKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 - 5 พลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Xba*I

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1     TGGTACCAATCTGCTGCTCAGCCGGCGAAAAATGTTGAAAAGGATTATATTGTCGGATTT  60
      W  Y  Q  S  A  A  Q  P  A  K  N  V  E  K  D  Y  I  V  G  F

61    AAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCCGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAGAGCGGCGGAAAA  120
      K  S  G  V  K  T  A  S  V  K  K  D  I  I  K  E  S  G  G  K

121   GTGGACAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCGGCAAAAGCGAAGCTAGACAAAGAAGCGCTT  180
      V  D  K  Q  F  R  I  I  N  A  A  K  A  K  L  D  K  E  A  L

181   AAGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTATGTGGAAGAGGATCATGTGGCCCATGCC  240
      K  E  V  K  N  D  P  D  V  A  Y  V  E  E  D  H  V  A  H  A

241   TTGGCGCAAACCGTTCCTTACGGCATTCCTCTCATTAAAGCGGACAAAGTGCAGGCTCAA  300
      L  A  Q  T  V  P  Y  G  I  P  L  I  K  A  D  K  V  Q  A  Q

301   GGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGCCGTCCTGGATACAGGAATCCAAGCTTCTCAT  360
      G  F  K  G  A  N  V  K  V  A  V  L  D  T  G  I  Q  A  S  H

361   CCGGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACCGAC  420
      P  D  L  N  V  V  G  G  A  S  F  V  A  G  E  A  Y  N  T  D

421   GGCAACGGACACGGCACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGCGCTTGACAATACAACGGGT  480
      G  N  G  H  G  T  H  V  A  G  T  V  A  A  L  D  N  T  T  G

481   GTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGGTTAAAGTACTGAATTCAAGCGGA  540
      V  L  G  V  A  P  S  V  S  L  Y  A  V  K  V  L  N  S  S  G

541   AGCGGATCATACAGCGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACAAACGGCATGGAT  600
      S  G  S  Y  S  G  I  V  S  G  I  E  W  A  T  T  N  G  M  D

601   GTTATCAATATGAGCCTTGGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGATGAAACAGGCAGTCGAC  660
      V  I  N  M  S  L  G  G  A  S  G  S  T  A  M  K  Q  A  V  D

661   AATGCATATGCAAGAGGGGTTGTCGTTGTAGCTGCAGCAGGGAACAGCGGATCTTCAGGA  720
      N  A  Y  A  R  G  V  V  V  V  A  A  A  G  N  S  G  S  S  G

721   AACACGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGATTCTGTCATCGCTGTTGGTGCGGTA  780
      N  T  N  T  I  G  Y  P  A  K  Y  D  S  V  I  A  V  G  A  V

781   GACTCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCT  840
      D  S  N  S  N  R  A  S  F  S  S  V  G  A  E  L  E  V  M  A

841   CCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTATGCAACATTGAACGGAACG  900
      P  G  A  G  V  Y  S  T  Y  P  T  N  T  Y  A  T  L  N  G  T

901   TCAATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGTCAAAACATCCGAAC  960
      S  M  A  S  P  H  V  A  G  A  A  A  L  I  L  S  K  H  P  N

961   CTTTCAGCTTCACAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTATTTGGGAAGCTCC  1020
      L  S  A  S  Q  V  R  N  R  L  S  S  T  A  T  Y  L  G  S  S

1021  TTCTACTATGGGAAAGGTCTGATCAATGTCGAAGCTGCCGCTCAAGGTCTAGAT  1074
      F  Y  Y  G  K  G  L  I  N  V  E  A  A  A  Q  G  L  D
```

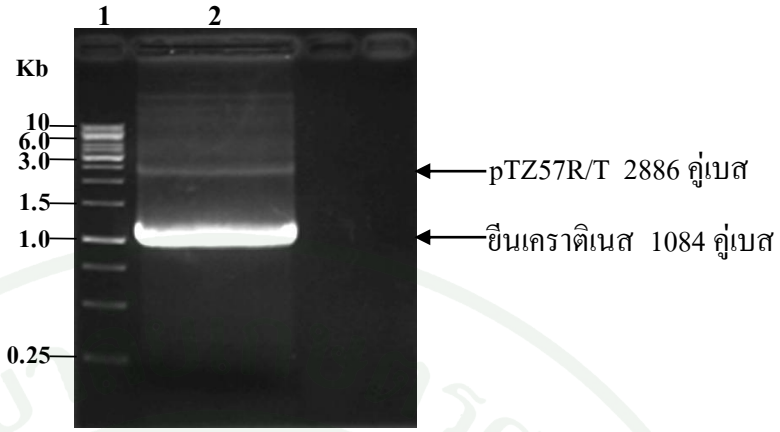
ภาพที่ 23 ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pTKER โดย แถบสีฟ้า คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Kpn*I และ *Xba*I ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 การ subclone ที่มียีนเคราติเนสเข้าสู่ pPICZα B expression vector

นำพลาสมิดลูกผสม pTKER ที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ มาทำการตัดยีนเคราติเนสออกจากพลาสมิด ลูกผสม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (Double digestion) คือ *Kpn*I และ *Xba*I ในขณะเดียวกันก็ทำการตัดพลาสมิด pPICZα B ด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเช่นเดียวกัน เพื่อต้องการให้ ชิ้นดีเอ็นเอของยีนเคราติเนสเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pPICZ α B ในตำแหน่งจดจำเดียวกัน เป็นการช่วยควบคุมทิศทางของการเชื่อมต่อให้มีความถูกต้อง โดยหลังจากได้ ทำการตัดพลาสมิดลูกผสม pTKER และพลาสมิด pPICZα B แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1084 คู่เบส 2886 คู่เบส และ 3600 คู่เบส ซึ่งก็คือ ยีนเคราติเนส (ภาพที่ 24 ช่องที่ 2) พลาสมิด pTZ57R/T (ภาพที่ 24 ช่องที่ 2) และพลาสมิด pPICZα B (ภาพที่ 25 ช่องที่ 2) เมื่อนำดีเอ็นเอที่บ ริสุทธิ์ของยีน เคราติเนสเชื่อมต่อกับ พลาสมิด pPICZα B ในตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Kpn*I และ *Xba*I (ภาพที่ 26) จะทำให้ได้พลาสมิด ลูกผสม pPKER จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมนี้ เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5α โดยวิธี heat shock ตามวิธีในหัวข้อ 1.1.3 แล้ว นำไปเลี้ยง บนอาหารคัดเลือก LB ที่เติม ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบโคโลนีปรากฏขึ้นบนอาหารคัดเลือก มากกว่า 300 โคโลนี จึงสุ่มโค โลนีมาสกัดพลาสมิดด้วย QIAprep®Spin Miniprep kit และนำพลาสมิด ลูกผสม pPKER ที่สกัดได้ (ภาพที่ 30 ช่องที่ 6) มาเป็นแม่แบบในการตรวจสอบด้วยเทคนิค พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC 1 และ RPIC1 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1084 คู่เบส (ภาพที่ 27) จากนั้นนำพลาสมิด ลูกผสมเดียวกันนี้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I ทำให้ พบแถบดีเอ็นเอสองขนาด คือแถบดีเอ็นเอขนาด 3574 คู่เบสเป็นขนาดของพลาสมิด pPICZα B และแถบดีเอ็นเอขนาด 1084 คู่เบสเป็นขนาดของยีนเคราติเนส (ภาพที่ 28) แล้วนำพลาสมิดลูกผสมนี้ส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1-Base ประเทศมาเลเซีย พบว่ายีนเคราติเนสเชื่อมต่อกับ บริเวณ alpha- factor signal sequence ในพลาสมิดลูกผสม pPKER ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I ได้ถูกต้องตามเฟรมการแปล รหัสเป็นกรดอะมิโน (ภาพที่ 29) และลำดับเบสของยีนเคราติเนสภายในพลาสมิดไม่ได้มีความแตกต่างไปจากลำดับเบสของยีนเคราติเนสที่ ได้ทำการวิเคราะห์มาก่อน จึงถ่ายโอนพลาสมิด ลูกผสม pPKER เข้าสู่ *P. pastoris* Y11430

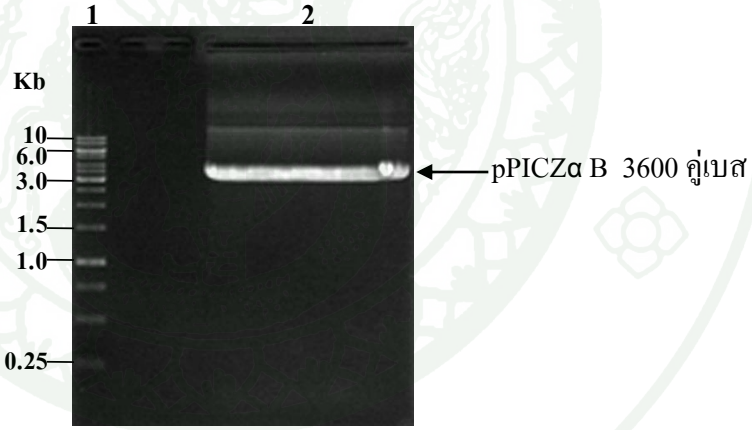
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 การตัดพลาสมิดลูกผสม pTKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิดลูกผสม pTKER ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I

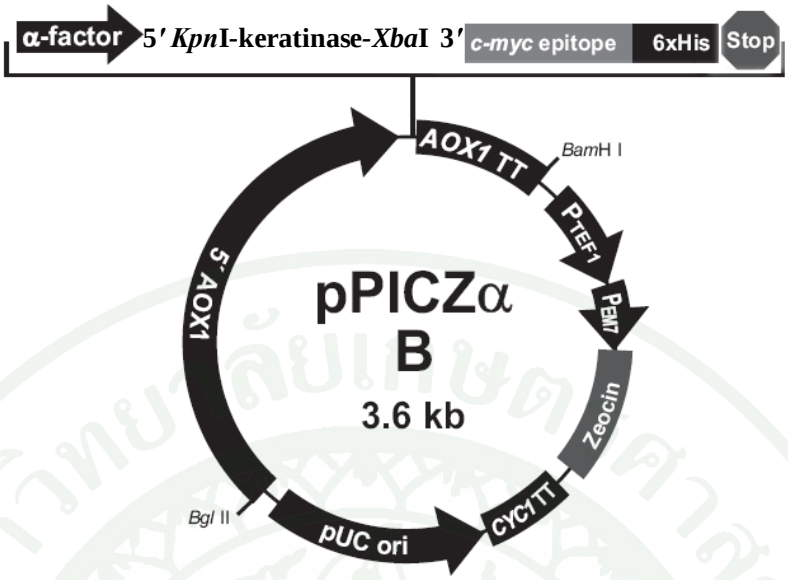


ภาพที่ 25 การตัดพลาสมิด pPICZα B ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I

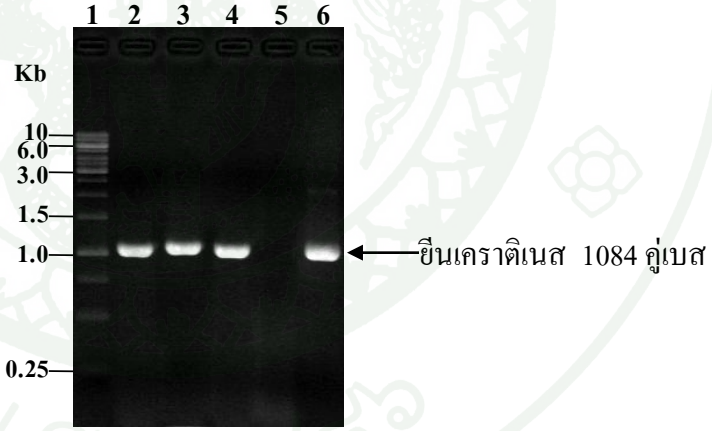
ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pPICZα B ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 26 การเชื่อมต่อระหว่างยีนเคราติเนสกับพลาสมิด pPICZα B ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I



ภาพที่ 27 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1 ที่ใช้พลาสมิดลูกผสม pPKER เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

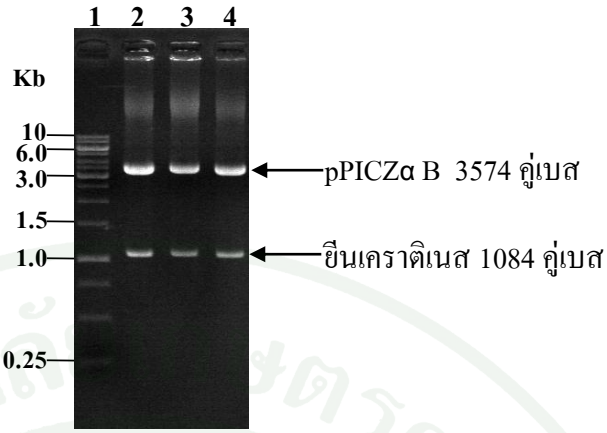
ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 - 4 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์

ช่องที่ 5 negative control

ช่องที่ 6 positive control

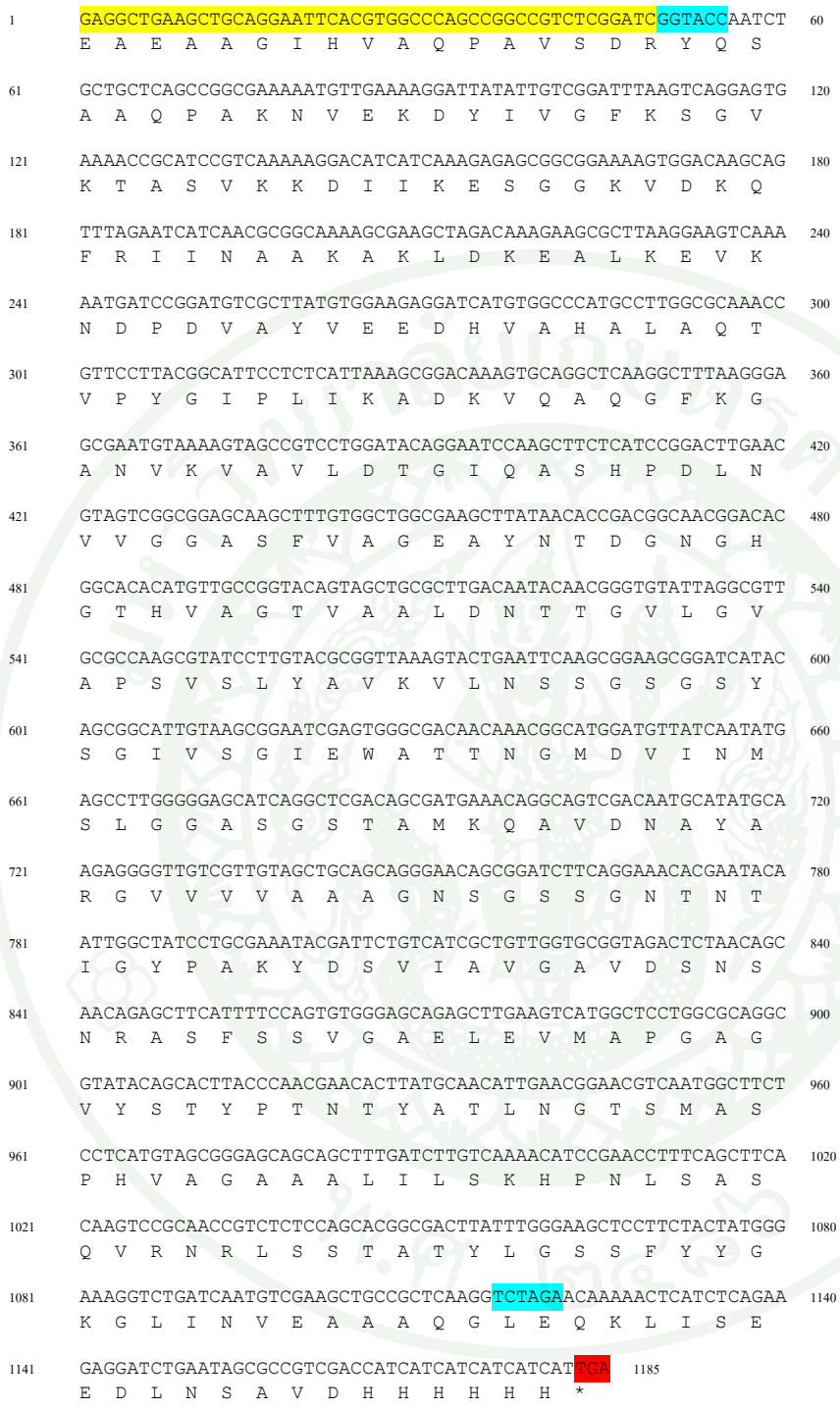
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 28 การตัดพลาสมิดลูกผสม pPKER ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I
ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder
ช่องที่ 2 - 4 พลาสมิดลูกผสม pPKER ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Xba*I

โดยการนำพลาสมิด pPKER มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Sac*I เพื่อให้พลาสมิดลูกผสมอยู่ในรูป Plasmid linearized ขนาด 4658 คู่เบส (ภาพที่ 30 ช่องที่ 7) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I จะตัดพลาสมิดภายในบริเวณ 5′ *AOX1* promoter ทำให้บริเวณ 5′ *AOX1* promoter นี้แยกออกจากกัน จากนั้นจึงนำไปถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell ของ *P. pastoris* Y11430 โดยวิธี Electroporation ตามวิธีในหัวข้อ 2.3 หลังการถ่ายโอนสำเร็จจะเกิดการรวมเข้าด้วยกัน (integration) ระหว่างบริเวณ 5′ *AOX1* promoter กับบริเวณ 5′ *AOX1* ของเซลล์ยีสต์เจ้าบ้าน (Invitrogen, 2010b: 9) ขั้นตอนต่อไปจึงทำการ คัดเลือก เซลล์ยีสต์ลูกผสมที่เจริญ บนอาหาร YPD agar ที่เติม Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบโคโลนีของยีสต์เกิดขึ้นในเวลา 48-72 ชั่วโมง จึงสุ่มเลือกโคโลนี สำหรับการผลิตเอนไซม์เคราติเนส โดยนำโคโลนีที่คัดเลือกมาสกัดโครโมโซม (ภาพที่ 30 ช่องที่ 2 และ 3) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ในการตรวจสอบด้ว ยเทคนิค พีซีอาร์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1 ที่จำเพาะกับยีนเคราติเนส พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1084 คู่เบส เป็นขนาดของยีน เคราติเนส (ภาพที่ 31) ซึ่งเป็นผลยืนยันว่าโคโลนียีสต์ ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ที่สุ่มเลือกมีการสอดแทรกยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ในโครโมโซมของยีสต์ลูกผสมอยู่จริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



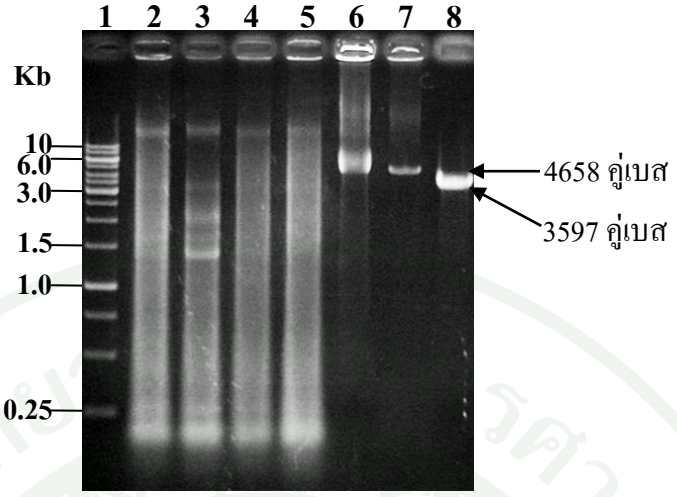
ภาพที่ 29 ลำดับเบสของยีนเคราติเนสบนพลาสมิดลูกผสม pPKER

แถบสีฟ้าเหลือง คือ ตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับ alpha-factor signal sequence

แถบสีฟ้า คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Kpn*I และ *Xba*I ตามลำดับ

แถบสีแดง คือ stop codon

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 30 โครโมโซมของเซลล์ยีสต์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 2 โคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก YPD agar ที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 โครโมโซมจากยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1)

ช่องที่ 3 โครโมโซมจากยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2)

ช่องที่ 4 โครโมโซมจาก *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม

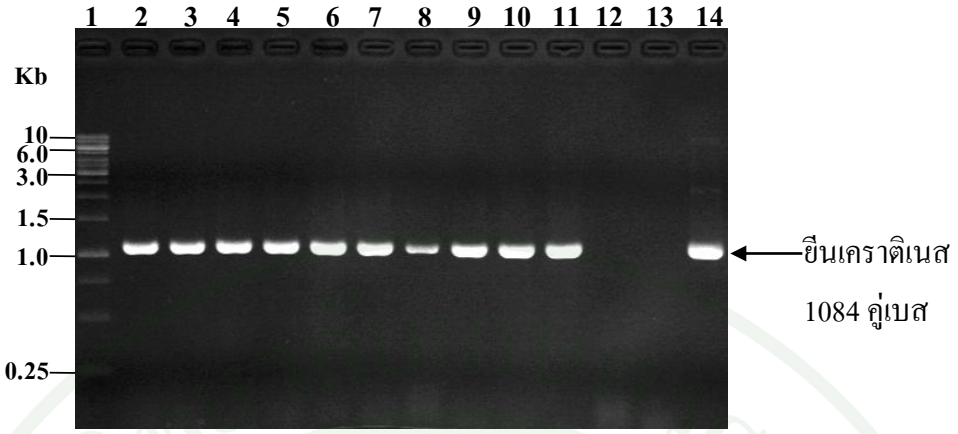
ช่องที่ 5 โครโมโซมจาก *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B)

ช่องที่ 6 พลาสมิดลูกผสม pPKER จาก *E. coli* DH5α (pPKER)

ช่องที่ 7 พลาสมิดลูกผสม pPKER ขนาด 4658 คู่เบส หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I

ช่องที่ 8 พลาสมิด pPICZα B ขนาด 3597 คู่เบส หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 31 การตรวจสอบยีนเคราติเนสบนโครโมโซมของเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ FPIC1 และ RPIC1

ช่องที่ 1 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 - 11 ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์โดยใช้โครโมโซมจากยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) ถึง *P. pastoris* Y11430 (pPKER-10) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องที่ 12 negative control 1 ใช้โครโมโซมจาก *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องที่ 13 negative control 2 ใช้โครโมโซมจาก *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องที่ 14 positive control

2.5 การตรวจสอบโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER)

นำโคโลนียีสต์ ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 10 โคโลนีที่ยืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วนั้น มาทำการคัดเลือกหาโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้ ในปริมาณสูงเพื่อนำไปทดสอบต่อไป โดยในขั้นแรกนำเซลล์ยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 10 โคโลนี และยีสต์ที่ใช้เป็นตัวควบคุม 2 โคโลนี ซึ่งได้แก่ยีสต์ *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และยีสต์ *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B) มาผลิตโปรตีนตามวิธีการในหัวข้อ 2.5 แล้วทำการเก็บตัวอย่างตามช่วงเวลาที่ 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บมาปั่นเหวี่ยงแยกเอาน้ำเลี้ยงเซลล์ มาทดสอบความ สามารถในการสร้าง วงใสบนอาหา รสคิมมิลค์อะการ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลภายหลัง จากหยดน้ำเลี้ยงเซลล์ลงบนรูที่เจาะไว้บนอาหาร พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 10 โคโลนี ที่เก็บจากชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป สร้างวงใสรอบ รูที่เจาะบนอาหารสคิมมิลค์อะการ์หลังจากเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทั้ง 2 โคโลนี พบว่าทุกตัวอย่างที่เก็บนั้นไม่สามารถสร้างวงใสบนอาหาร สคิมมิลค์อะการ์ได้ จากนั้นจึงได้นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จากชั่วโมงที่ 72 ของยีสต์ทั้ง 12 โคโลนีมาตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการในหัวข้อ 3.3 พร้อมกับตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสตามวิธีการในหัวข้อ 3.4 ผลการ ตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ตารางที่ 4) พบว่าสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 10 โคโลนีที่นำมาทดสอบ โดยพบว่า *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) และ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าโคโลนีอื่นๆ คือ 10.643 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 11.268 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากยีสต์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทั้ง 2 โคโลนี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบบนอาหารสคิมมิลค์อะการ์ ส่วนการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสพบว่าไม่สามารถตรวจหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้จากยีสต์ ทั้ง 12 โคโลนี ในขณะเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ จากชั่วโมงที่ 24 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 22.29 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส 5.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ยีสต์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) ทั้ง 10 โคโลนี แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้งที่ใช้เวลาในการผลิตนาน กว่า แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของชนิดและระบบเอนไซม์โปรติเอสที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ลูกผสม ยีสต์และเชื้อสายพันธุ์ ดั้งเดิม การที่เอนไซม์เคราติเนสสามารถแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้นั้น เนื่องจากเอนไซม์เคราติเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 จัดอยู่ในกลุ่ม serine protease (สุดาทิพย์, 2546) ซึ่งสามารถแสดงการย่อยสับสเตรทเคซีนที่มีอยู่ในอาหารสคิมมิลค์อะการ์ ได้ (สุทธิพันธุ์, 2540) แต่ในขณะเดียวกัน พบว่าไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสจากการใช้ขนไก่ป่นเป็นสับสเทรตได้ ซึ่งอาจเป็นดังเช่นผลการทดลองของกฤษณี (2545: 44-48) และ ณัฐวดี (2546: 49-54) ที่พบว่าเซลล์ลูกผสม *B. subtilis* ที่ได้รับการถ่ายทอดยีน จาก *B. licheniformis* KUB-K0006 และ *B. licheniformis* KUB-K0082 ตามลำดับ นั้นสามารถแสดงการย่อยเคซีนในอาหาร สคิมมิลค์อะการ์ได้ แต่เซลล์ลูกผสม *B. subtilis* บางโคโลนีไม่สามารถย่อยขนไก่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) และ *P. pasto ris* Y11430 (pPKER-2) มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส- เพจ ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5 แล้วย้อมด้วยสี Silver Stain ผลจากการตรวจสอบโปรตีน จาก *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) และ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) โดยเปรียบเทียบกับ โปรตีนจาก *P. pastoris* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ สามารถตรวจพบโปรตีนขนาด 47 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 32 และภาพที่ 33) ในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์จาก *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) และ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 47 กิโลดาลตัน ในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์จาก *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิมและ *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B) ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สามารถยืนยันได้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่วัดได้นั้นเป็นผลมาจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ยีสต์ลูกผสมทั้ง 2 ผลิตขึ้นจริงเพราะพบแถบโปรตี นขนาด 47 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ไม่ได้เป็นผลมาจากเอนไซม์โปรติเอสที่เซลล์ยีสต์เจ้าบ้านผลิตขึ้ น เนื่องจาก ไม่พบแถบโปรตีนจาก *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิมและ *P. pastoris* Y11430 (pPICZ α B) จากนั้นทำการทดสอบต่อไปโดยพิจารณาเลือกโคโลนี ของ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) และ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) ซึ่งแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สูงกว่าโคโลนีอื่นๆ มาตรวจสอบความสามารถในการย่อยขนไก่ของเซลล์ยีสต์ลูกผสมตามวิธีการในหัวข้อ 3.6 พบว่าหลังจากเลี้ยงเซลล์ยีสต์ลูกผสมในอาหารทดสอบเ ป็นเวลา 14 วัน แล้วนำขนไก่ออกมาตรวจสอบโดยการ สังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า ขนไก่ที่ทดสอบกับ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) แสดงลักษณะเป็นขุยเกิดขึ้น (ภาพที่ 34 A1และB1) แต่ขนไก่ที่ทดสอบกับ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) ไม่แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 34 A2 และ B2) ส่วนขนไก่ที่ทดสอบกับ *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่แสดง ลักษณะการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 34 A3และB3) เช่นเดียวกับขนไก่ที่ทดสอบกับ *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B) ก็ไม่แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 34 A4 และ B4) เช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จาก	ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (U/ml)
P. pastoris Y11430 (pPKER-1)	10.463
P. pastoris Y11430 (pPKER-2)	11.268
P. pastoris Y11430 (pPKER-3)	9.793
P. pastoris Y11430 (pPKER-4)	9.323
P. pastoris Y11430 (pPKER-5)	7.445
P. pastoris Y11430 (pPKER-6)	9.994
P. pastoris Y11430 (pPKER-7)	6.171
P. pastoris Y11430 (pPKER-8)	9.927
P. pastoris Y11430 (pPKER-9)	9.189
P. pastoris Y11430 (pPKER-10)	6.037
P. pastoris Y11430 (wild-type strain)	-
P. pastoris Y11430 (pPICZα B)	0.939

หมายเหตุ สัญลักษณ์ – หมายถึงไม่สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้

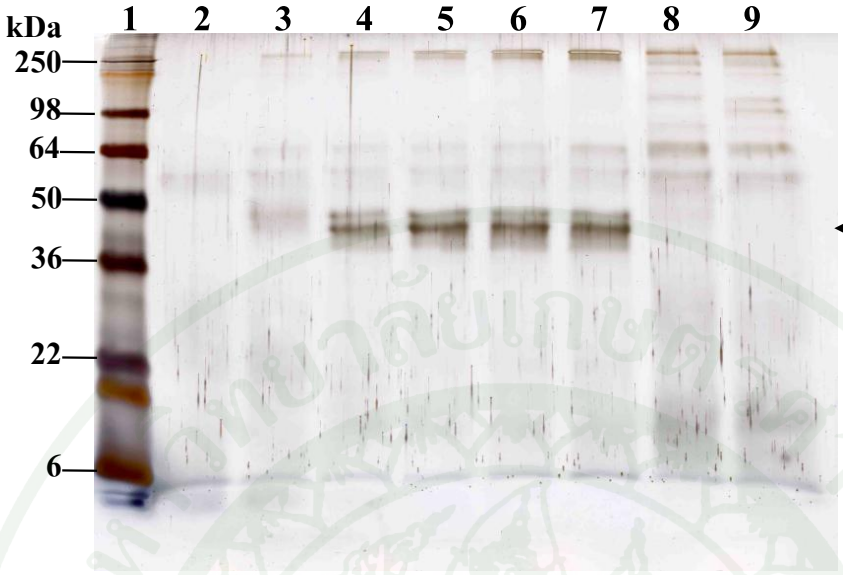
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER) หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จาก	ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (U/ml)
P. pastoris Y11430 (pPKER-1)	5.679
P. pastoris Y11430 (pPKER-2)	-
P. pastoris Y11430 (wild-type strain)	-
P. pastoris Y11430 (pPICZα B)	-

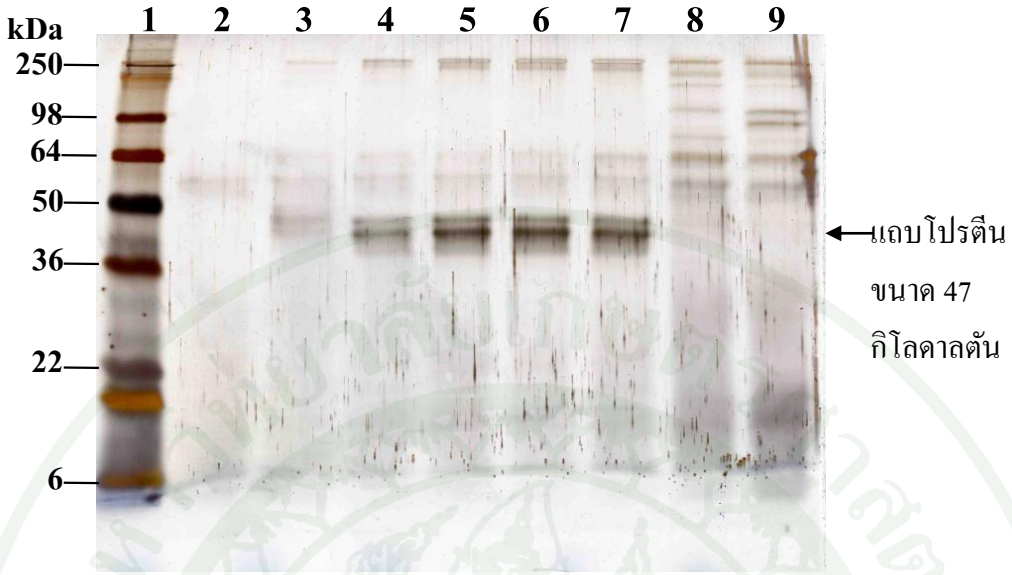
หมายเหตุ สัญลักษณ์ – หมายถึงไม่สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



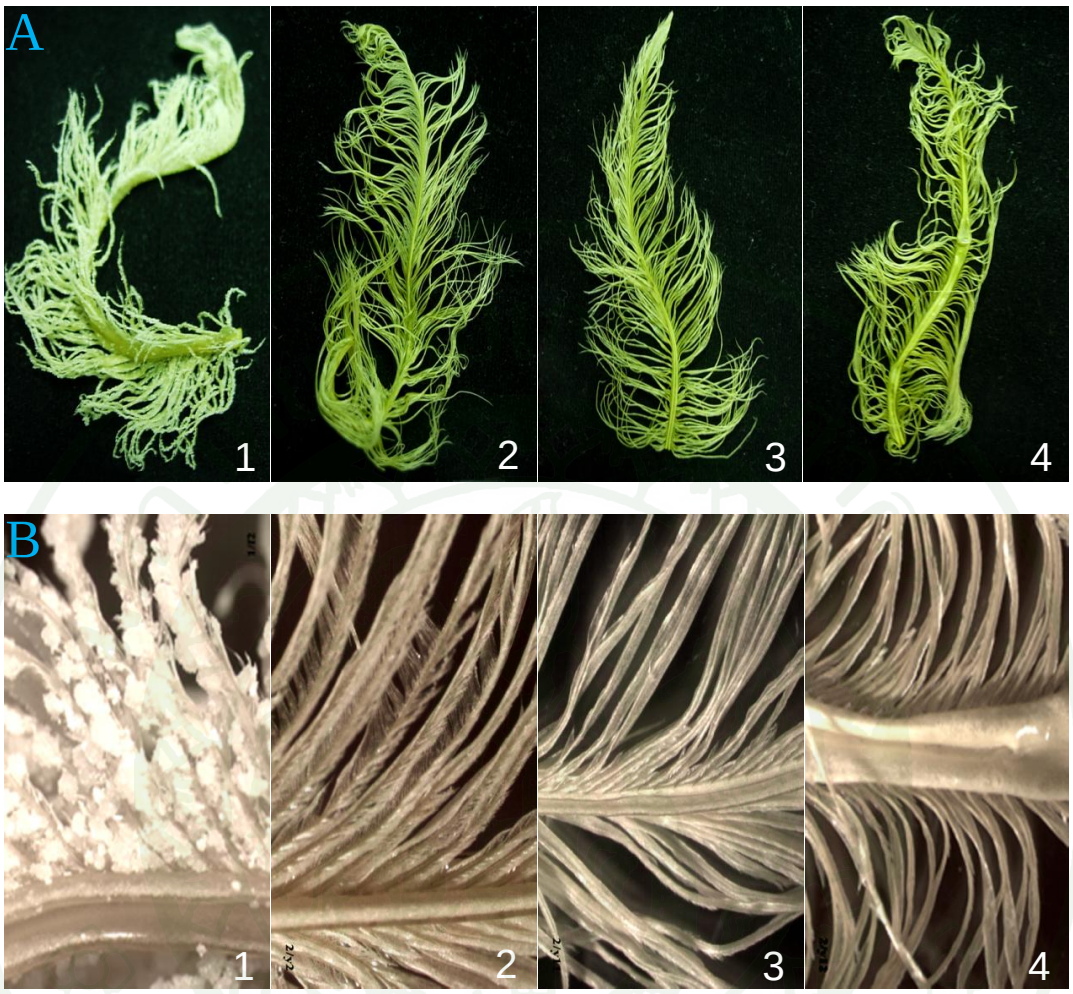
ภาพที่ 32 การตรวจสอบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเซลล์ (crude enzyme) จาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1) เปรียบเทียบกับ *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส- เพจ โดยช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Bio-Rad, USA), ช่องที่ 2-7 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลา (0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ), ช่องที่ 8 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์จาก *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิมที่เก็บจากชั่วโมงที่ 96, ช่องที่ 9 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์ จาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B) ที่เก็บจากชั่วโมงที่ 96

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 33 การตรวจสอบโปรตีนใน น้ำเลี้ยงเซลล์ (crude enzyme) จาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2) เปรียบเทียบกับ *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส- เพจ โดยช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Bio-Rad, USA), ช่องที่ 2-7 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บตัวอย่างตามช่วงเวลา (0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ), ช่องที่ 8 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์จาก *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เก็บจากชั่วโมงที่ 96, ช่องที่ 9 คือ น้ำเลี้ยงเซลล์ จาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B) ที่เก็บจากชั่วโมงที่ 96

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 34 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยขนไก่ ของเซลล์ยีสต์ลูกผสมหลังจากย่อยเป็นเวลา 14 วัน โดย A คือ ลักษณะขนไก่ที่ทดสอบการย่อยในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลล์เซียส ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที จากกล้อง Compact Digital และ B คือ ลักษณะขนไก่ที่ทดสอบการย่อยในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลล์เซียส ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที จากกล้อง Stereo Microscope ตัวเลข 1 คือ ผลการย่อยจาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1) ตัวเลข 2 คือ ผลการย่อยจาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2) ตัวเลข 3 คือ ผลการย่อยจาก *Pichia pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม ตัวเลข 4 คือ ผลการย่อยจาก *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZα B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และจากการตรวจสอบขนไก่ภายใต้กล้อง Stereo Microscope พบว่าขนไก่ที่แสดงลักษณะ เป็นขุยที่สังเกตเห็นด้วยตาเปล่านั้นมีลักษณะคล้ายกับผลึกมาเกาะรวมกันบริเวณผิวของขนไก่ (ภาพที่ 34 B1) เมื่อปั่นแยกส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบ บนอาหาร สคิมมิลค์อะการ์ และนำไปวิเคราะห์ หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์จาก *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) สามารถสร้างวงใสบนอาหาร ได้ แต่น้ำเลี้ยงเซลล์จาก *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) ไม่สร้างวงใสบนอาหาร ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์จาก *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *P. pastoris* Y11430 (pPICZ α B) ไม่สร้างวงใสบนอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดย *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 5.679 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วน *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) *P. pastoris* Y11430 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ *P. pastoris* Y11430 (pPICZα B) ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้ (ตารางที่ 5)

เมื่อนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่วัดค่าในครั้งแรกซึ่งแสดงค่าในตารางที่ 4 เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่วัดค่าได้ในครั้งหลังซึ่งแสดงในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นความไม่เสถียรในการแสดงออกของยีน โดยพบว่าในครั้งแรกสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-2) ได้ แต่ในครั้งหลังพบว่าไม่สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้ ซึ่งแตกต่างกับ *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) ที่สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้ทั้งสองครั้ง ทั้งๆที่ยีสต์ลูกผสมทั้ง 2 โคโลนีนั้นได้รับการถ่ายทอดยีนเคราติเนสมาเหมือนกัน สาเหตุของความไม่เสถียรที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากการแสดงออกของยีนจากภายนอกในระดับที่สูงเป็น สาเหตุที่ทำให้เกิด metabolic load ของเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจาก *AOX1* promoter เป็น strong promoter ที่สามารถแสดงออกได้ในระดับที่สูง แต่ก็มีรายงานว่าระดับ การแสดงออกที่สูง นี้อาจทำให้กลไกการเปลี่ยน แปลงของโปรตีนหลังจากการทรานสเลชัน (post-translation) เกิดขึ้นได้ไม่ทัน ส่งผลให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตเกิด misfolded และ/หรือ unprocess และ/หรือ mislocalized (Brierley, 1998; Thill *et al*., 1990) หรืออาจเป็นผลกระทบที่เกิดขึ้นของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ระหว่าง การเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง และมีตัวอย่างซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิด mutation ของยีนในเซลล์เจ้าบ้านมีผลไปยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ในเวคเตอร์สำหรับการแสดงออก (Romanos *et al*., 1992: 467) ในส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1) ที่วัดครั้งแรกได้ค่าสูงกว่าการวัดครั้งหลัง อาจเนื่องจากในครั้งหลังนี้เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 14 วัน ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตออกมาอาจถูกย่อยหรือถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่ใช้เลี้ยงโดย extracellular protease (Kang *et al*., 2000) ของเซลล์ยีสต์เจ้าบ้านหรือ intracellular protease จากการสลายของเซลล์ยีสต์เจ้าบ้าน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการตรวจสอบโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER) แสดงให้เห็นว่ายีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 แสดงออกในระบบ *P. pastoris* Y11430 ได้ โดยใช้เวคเตอร์ pPICZα B สำหรับการแสดงออก ของยีนภายใต้ alcohol oxidase (*AOX I*) methanol inducible promoter และเอนไซม์เคราติเนสที่ผลิตได้ ถูกขับออกภายนอกเซลล์ ด้วยการทำงานของ *S. cerevisiae* α-factor sequence ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Radha and Gunasekaran (2009) ที่ประสบความสำเร็จในการแสดงอ อกของยีนเคราติเนสจ าก *B. licheniformis* MKU3 โดยใช้เวคเตอร์ pPICZα A (แตกต่างจาก pPICZα B เฉพาะบริเวณ Multiple Cloning Site เท่านั้น) และการที่โปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2) ถูกขับ ออกภายนอกเซลล์รวมถึงแสดงค่ากิจกรรมของเอน ไซม์โปรติเอสได้ ซึ่ง แตกต่างจากโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* Rosetta (pFKER) และ *E. coli* TOP10 (pFKER) ที่อยู่ในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก คาดว่าเนื่องจาก *P. pastoris* Y11430 เป็นเซลล์ยูแคริโอตมีขบวนการ post-translational modifications เช่น proteolytic processing, folding, disulfide bond formation และ glycosylation ดังนั้นโปรตีนจำนวนมากที่ผลิตออกมาใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ในระบบแบคทีเรียนั้นสามารถผลิตออกมาใน รูป biologically active molecules (Cregg, n.d.) และสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้

เมื่อเปรียบเทียบขนาดโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2) กับโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* Rosetta (pFKER) และ *E. coli* TOP10 (pFKER) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส- เพจ พบว่าโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2) มีขนาด 47 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่มีขนาด 54 กิโลดาลตัน นั้นอาจเนื่องมาจากโปรตีนที่ผลิตจาก เซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นโปรตีนที่ผลิตออกมา ในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ซึ่งอนุภาคของโปรตีนส่วนนี้ยังประกอบไปด้วยโปรตีนที่เซลล์เจ้าบ้านผลิตขึ้นเองจำนวนหนึ่งซึ่งมีอยู่น้อยและส่วนประกอบของ ribosomal หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ (Rinas and Baily , 1992; Valax and Georgiou , 1993) และเนื่องจากโปรตีนไม่ ถูกขับ ออกภายนอกเซลล์ ดังนั้นโปรตีนอาจมีส่วน *omp*A signal peptide ที่ได้รับมาจากพลาสมิดลูกผสม pFKER รวมอยู่ด้วยจึงทำให้พบแถบโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีขนาดใหญ่กว่าโปรตีนจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบขนาดโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2) กับโปรตีนที่ผลิตจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าอาจเป็นโปรตีน ที่ถูกกำหนดรหัสการสร้างมาจากยีนคนละยีนกัน โดยโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2) มีขนาด 47 กิโลดาลตัน ส่วนโปรตีนที่ผลิตจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ซึ่งมีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน (สุทธิพันธุ์, 2540; สุดาทิพย์, 2546) และแสดงคุณสมบัติที่แตกต่างกันซึ่งสังเกตได้จากผลการตรวจสอบการย่อยขนไก่ในอาหารเหลว โดย *B. lichenif ormis* KUB-K0006 สามารถย่อยขนไก่ได้แต่ เซลล์ลูกผสม *P. pastoris* Y11430 (pPKER-1 และ pPKER-2) นั้นไม่ย่อยขนไก่ นอกจากนั้น มีงานวิจัยที่นำยีนเคราติเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* PWD-1 ที่มีชื่อเรียกว่า ยีน *ker A* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนมากถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn และ blastx ไปทำการโคลนและแสดงออกใน *B. subtilis* DB104 (Lin *et al*., 1997) และ *P. pastoris* X33 (Porres *et al*.,2002) พบว่ายีนมีการแสดงออกโดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้จากการใช้ azokeratin เป็นสับสเทรต ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยที่นำยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* MKU3 ซึ่งยีนเคราติเนสนี้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสและลำดับกรด อะมิโนมากถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastn และ blastx ไปทำการโคลนและแสดงออกในเชื้อ *B. megaterium* MS941 และ *P. pastoris* X33 (Radha and Gunasekaran , 2009) พบว่ายีนมีการแสดงออกโดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้จากการใช้ keratin azure ซึ่งเป็นสับสเทรตทางการค้า แต่จากการตรวจเอกสารไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เคราติเนสลูกผสม ที่ใช้ขนไก่บดเป็นสับสเทรตในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสเหมือนเช่นในการทดลองครั้งนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. สามารถโคลนยีน เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้าสู่ *E. coli* Rosetta และ *E. coli* TOP10 ได้เป็นผล สำเร็จ ยืนยันผล จากการ ตรวจสอบด้วยเทคนิค พีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน การตัดพลาสมิดลูกผสมด้ว ยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เซลล์ลูกผสม *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 54 กิโลดาลตัน แต่โปรตีนที่ผลิตนั้นอยู่ในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก จึงทำให้โปรตีนไม่ถูกส่งออกมายังภายนอกเซลล์และไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

2. สามารถโคลนยีน เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เข้าสู่ *P. pastoris* Y11430 ได้เป็นผลสำเร็จ ยืนยันผลจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค พีซีอาร์ เซลล์ยีสต์ลูกผสม สามารถผลิตและปลดปล่อย รีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 47 กิโลดาลตัน ออกนอกเซลล์ได้ รีคอมบิแนนท์โปรตีนแสดงการย่อย สับสเทรตเคซีนบนอาหารสคิมมิลค์อะการ์ แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส แต่ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสจากการใช้ขนไก่ บดเป็นสับสเทรตและไม่สามารถย่อยขนไก่ในอาหารเหลวได้ นอกจากนั้นยังพบความไม่เสถียรในการแสดงออกของเซลล์ยีสต์ลูกผสม

3. ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 โดยระบบ *P. pastoris* Y11430 ว่าสามารถทำได้แต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมากเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสให้ได้จำนวนมากและสามารถนำเอ นไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. มีรายงานการใช้กลยุทธ์ Co-overexpression ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจโดยให้มีการแสดงออกร่วมกันระหว่างยีนที่กำหนดการสร้าง chaperone และยีนที่เป็นเป้าหมายในการแสดงออก ซึ่งสามารถป้องกันการเ กิดโปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ได้เนื่องจาก chaperone คือโปรตีนที่ช่วยรักษาการม้วนพับของโปรตีนที่เป็นเป้าหมายให้อยู่ในสภาพ soluble protein (Bollag *et al.,* 1996: 51) สำหรับ chaperone ที่มีบทบาทสำคัญคือ DnaK (Hsp70 chaperone family) ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิด โปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก โดยจะไปลดการรวมกันของ misfolded proteins และสนับสนุนกระบวนการ proteolysis ของ misfolded proteins (Mogk *et al.,* 2002) มีผลงานวิจัยยืนยันว่าการใช้กลยุทธ์ Co-overexpression ของ chaperone DnaK สามารถเพิ่มเปอร์เซ็ นต์ของ soluble human growth hormone จากการแสดงออกในระบบ *E. coli* ได้ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ (Blum *et al.,* 1992)

2. อาจทำการเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีนเคราติเนสเป็น *P. pastoris* X-33 (Mut^+, His^+) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีการแนะนำไว้ในคู่มือ pPICZα A, B, and C *Pichia* expression vectors (Invitrogen, 2010b) ว่ามีความเหมาะสมในการแสดงออกของยีนเมื่อใช้คู่กับพลาสมิด pPICZα A, B และ C นอกจากนั้นได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนเคราติเนสโดยใช้ระบบการแสดงออกดังก ล่าว พบว่าสามารถแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้สูงสุดที่ 285 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 144 ชั่วโมง (Porres *et al*.,2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. 2552. **ปริมาณการนำเข้า/ส่งออกวัตถุดิบและอาหารเสริมสำหรับสัตว์**. สถิติการนำเข้า-ส่งออกสินค้าปศุสัตว์. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/ict/th/images/stories/im_ex_livestock_good/2552/dec-52.pdf, 19 เมษายน 2555.

กฤษณี รังสิยานนท์. 2545. **การโคลนยีนแสดงเอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ขวัญคณิศร์ อินทรตระกูล. 2551. **การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน *Bacillus subtilis***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐวดี จันทศิลา. 2546. **การโคลนยีน *sukC* ซึ่งแสดงโปรตีนเคราติเนสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* KUB-K0082.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์. 2540. **การศึกษาเอนไซม์เคราติเนสจากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยขนไก่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกัญญา จัตตุพรพงษ์ . 2539. **การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร . 2555. **ปริมาณการผลิตไก่เนื้อปี 2552-2553**. ผลผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ . แหล่งที่มา : http :// www .oae .go .th /ewt _news .php ?nid =9704 , 24 มกราคม 2555.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และ สาโรจน์ ค้าเจริญ. 2521. การศึกษาเบื้องต้นในการใช้ขนไก่ป่นเป็นอาหารโปรตีนสำหรับสุกรเนื้อ , น. 14. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาส ตร์ และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 16**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Baker, D.H., R.C. Blitenthal, K.P. Boebel, G.L. Czarnecki, L.L. Southern and G.M. Willis. 1981. Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal. **Poult. Sci.** 60: 1865-1872.

Balint, B., Z. Bagi, G. Rakhely, K. Perei and K.L. Kovacs. 2005. Utilization of keratincontaining biowaste to produce biohydrogen. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 69: 404-410.

Bernal, C., L. Vidal, E. Valdivieso and N. Coello. 2003. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 19: 255-261.

Blum, P., M. Velligan., N. Lin. and A. Matin. 1992. DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. **Biotechnol. (N Y).** 10:301–304.

Böckle, B., B. Galunsky. and R. Müller. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces pactum DSM 40530. **Appl. Environ. Microbiol**. 61: 3705-3710.

Bollag, D.M., M.D. Rozycki. and S.J. Edelstein. 1996. **Protein Methods**. A John Wiley and Sons, Inc, United States of America.

Brandelli, A. 2008. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technol.** 1:105-116.

Brierley, R.A. 1998. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). **Methods Mol. Biol.** 103: 149–177.

Cousens, L.S., J.R. Shuster., C. Gallegos., L.L. Ku., M.M. Stempien., M.S. Urdea., R. SanchezPescador., A. Taylor. and P. Tekamp-Olson. 1987. High Level Expression of Proinsulin in the Yeast, Saccharomyces cerevisiae. **Gene.** 61:265-275.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cai, C.G., J.S. Chen., J.J. Qi., Y. Yin. and X.D. Zheng. 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. **J. Zhejiang Univ. SCI. B.** 9:713-720.

Cereghino, G.P.L., J.L. Cereghino, C. Ilgen and J. Cregg. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13: 329–332.

_____ A.J. Sunga., J.L. Cereghino. and J.M. Cregg. 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*, pp. 157–169. *In* J.K. Setlow., ed. **Genetic Engineering: Principles and Methods.** Kluwer Academic/Plenum publishers, London.

Cereghino J.L. and J.M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS. Microbiol. Rev.** 24: 45–66.

Chen C.C., P.H. Wu, C.T. Huang and K.J. Cheng. 2004. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of a *Escherichia coli* phytase. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 315–320.

Choi, J.H. and S.Y. Lee. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64: 625–635.

Cregg, J. n.d. **The Pichia System.** Available Source: http://www.pichia.com/pichia_system.pdf, March 3, 2012.

Cregg, J.M., L. Cereghino, J. Shi. and D.R. Higgins. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnol.** 16: 23–52.

_____ T.S. Vedvick and W.C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Nat. Biotechnol.** 11: 905-910.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dagert, M. and S. D. Ehrlich. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. **Gene.** 6: 23-28.

Escarlata, R.C., C.G. Olivia, S.F. Joaquin, V. Antonio and G.F. Elena. 2010. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. **Microbial Cell Factories.** 9: 71.

Farag, A.M. and M.A. Hassan. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme Microb. Technol.** 34: 85-93.

Gradisar, H., S kern and J. Friedrich. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 196-200.

Gupta, R., Q.K. Beg and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 15-32.

_____ and P. Ramani. 2006. Microbial keratinases and their prospective application: an overview. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 21-33.

Han, X.Q. and S. Damodaran. 1998. Purification and characterization of protease Q : A detergent and urea-stable serine endopeptidase from *Bacillus pumilus*. **J. Agric. Food Chem.** 46 : 3596-3603.

Harrap, B.S. and E.F., Woods. 1964. Soluble derivatives of feather keratin II: Molecular weight and conformation. **J. Biochem.** 92: 1975-1987.

Higgins, D.R. and J.M. Cregg. 1998. **Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols.** Humana Press, New Jersey.

Hockney, R.C. 1995. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.** 13: 456-463.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Invitrogen. 2010a. ***Pichia*** **Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in** ***Pichia pastoris***. Available Source: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf, December 11, 2009.

_____. 2010b. **pPICZα A, B, and C** ***Pichia*** **expression vectors**. Available Source: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf, December 18, 2009.

Jahic, M. 2003. **Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with** ***Pichia pastoris*****.** Ph.D. Thesis, Royal Institute of Technology, S-10 691 Stockholm, Sweden.

Jakubowski. 2008. **mechanisms of enzyme catalysis.** catalysis. Available Source: http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olcatenzmech.html, March 5, 2008**.**

Kane J.F. and D..L Hartley. 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.** 6: 95-101.

Kang, H.A., E.S. Choi., W.K. Hong., J.Y. Kim., S.M. Ko., J.H. Sohn. and S.K. Rhee. 2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 575–582.

Koolman, J. and K.H. Roehm. 2005. **Color Atlas of Biochemistry**. 2nd ed. Thieme, New York.

Krueger, J.K., M.H. Kulke., C. Schutt. and J. Stock. 1989. Protein inclusion body formation and purification. **BioPharm. Manufacturing.** 3: 40-45.

Langeveld, J. P.M., J.J. Wang, D.F.K. Van de Wiel, G.C. Shih, J. Garssen, A Bossers and J.C.H. Shih. 2003. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and Sheep. **J. Infect. Dis.** 188: 1782-1789.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Latshaw, J.D., N. Musharaf and R. Retrum. 1994. Processing of feather meal to maximize its nutritional value poultry. **Anim. Feed Sci. Technol.** 47: 179-188.

Lederberg, J. 2004. ***E. coli* K-12.** Microbiologytoday vol 31**.** Available Source: http:// www. sgm.ac.uk/pubs/micro_today/pdf/080402.pdf, September 12, 2008.

Lee, C.G., P.R. Ferget and J.C.H. Shih. 1991. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. **FASEB J.** 59: 1312.

Lee, S.Y. 1996. High cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.** 14: 98–105.

Lehninger, A.L., Nelson, D. L. And Cox, M. M. 1993. **Principles of Biochemistry**. 2nd ed. Worth Publishers, New York.

Lin H.H., L.J. Yin. and S.T. Jiang. 2009. Cloning expression and purification of Pseudomonas aeruginosa keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3) pLysS expression system. **J. Agric. Food Chem.** 57: 3506–3511.

Lin X., S.L. Wong., E.S. Miller. and J.C.H. Shih. 1997. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 19:134–138.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Determination of protein with the Folin-Ciocalteau reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 256-270.

Maciver, Bryce, R.H Mchale, D.J. Saul and, P.L. Bergquist. 1994. Cloning and sequencing of serine proteinase gene from a thermophilic *Bacillus* species and its expression in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60(11): 3981-3988.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 60: 512–538.

Marston, A.O. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem. J.** 240: 1-12.

Mercedo, A.J., WOB. da Silva.,, R Gava, D. Driemeier, JAP. Henriques and C. Termignoni. 2005. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable deharing capabilities. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 591-596.

Mogk, A., M.P. Mayer. and E. Deuerling. 2002. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. **Chembiochem.** 3: 807–814.

Mohorcic, M., A. Torkar, J. Friedrich, J. Kristl and S. Murdan. 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **Int. J. Pharm**. 332: 196-201.

Noronha, E.F., B.D. Lima., C.M. Sa and C.R. Felix. 2002. Heterologous production of *Aspergillus fumigates* keratinase in *Pichia pastoris*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 563–568.

Pan, J.,Q.Huang and Y. Zhang. 2004. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function form *Bacillus pumilus*. **Curr. Microbio**l. 49: 165-169.

Papadopoulos, M.C., A.R. El Boushy, A.E. Roodbeen and E.H. Ketelaars. 1986. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Anim. Feed Sci. Technol.** 14: 279-290.

Parente, D., F. de Ferra., G. Galli. and G. Grandi. 1991. Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 77: 243–250.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Porres, J. M., M.J. Benito. and X.G. Lei. 2002. Functional expression of keratinase (ker A) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. **Biotechnol. Lett.** 24: 631–636.

Pushpam, P.L., T. Rajesh and P. Gunasekaran. 2011. Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome. **AMB Express**. 1: 3.

Radha, S. and P. Gunasekaran. 2007. Cloning and Expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. **J. Appl. Microbiol.** 103: 1301-1310.

_____ and _____. 2008. Sustained expression of keratinase gene under *PxylA* and *PamyL* promoters in the recombinant *Bacillus megaterium* MS941. **Bioresource Technol.** 99: 5528–5537.

_____ and _____. 2009. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains. **Protein Expr. Purif.** 64: 24–31.

Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. & Barrett, A.J. 2008. *MEROPS*: the peptidase database. **Nucleic Acids Res. 36**: 320-325.

Rinas, U. and J.E. Bailey. 1992. Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37:609-614.

Romanos M. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Curr. Opin. Biotechnol.** 6: 527–533.

Romanos, M.A., C.A. Scorer. and J.J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast.** 8: 423-488.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schallmey, M., A. Singh and O.P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol.** 50: 1-7.

Schoner, R.G., L.F. Ellis. and B.E. Schoner. 1985. Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli*, cells overproducing bovine growth hormone. **Nat. Biotechnol.** 3: 151-154.

Scorer C.A., R.G. Buckhlz, J.J. Clare and M.A. Romanos. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene.** 136: 111-119.

Sharma, R. and R. Gupta. 2010. Extracellular expression of keratinase Ker P from *Pseudomonas aeruginosa* in *E. coli*. **Biotechnol. Lett.** 32: 1863–1868.

Shin, J.C.H. and C.M. William. 1990. **Feather-lysate, a hydrolyzed feather feed ingredient and animal feeds contain the same**. US Patent. 4,908,220. 4 p.

Sigma-Aldrich Corporation. 2008. **pFLAG-CTS™ Expression Vector**. Available Source: http: //www. sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/E5269, September 10, 2008.

Tersch M von, Robbins HL. 1990. Efficient cloning in *Bacillus megaterium*: comparison to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cloning hosts. **FEMS Microbiol. Lett.** 70: 305–310.

Thanikaivelan P. 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends Biotechnol.** 22(4): 181-188.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Thill, G.P., G.R. Davis., C. Stillman., G. Holtz., R. Brierly., M. Engel., R. Buckholtz., J. Kenney., S. Provow., T. Vedvick and R.S. Siegel. 1990. Positive and negative ejects of multicopy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. *In* J. L. Cereghino and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev**. 24: 45-66.

Thomas, C.P., T.F. Booth. and P. Roy. 1990. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. **J. Gen. Virol.** 71: 2073–2083.

Tiwary, E., and R. Gupta. 2010. Extracellular Expression of Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli*. **J. Agric. Food Chem.** 58: 8380-8385.

Tuggle, K. and J.A. Fuchs. 1985. Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.** 162:448-450.

Valax, P. and G. Georgiou. 1993. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Prog.** 9:539–547.

Violand, B. N. 2001. Initial purification of Inclusion bodies, pp. 19-20. *In* S. Roe. **Protein purification applications**. Oxford University Press, United States.

Wang J.J., H.E. Swaisgood and J.C.H. Shih. 2003. Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems. **Biotechnol. Bioeng.** 81:421–429.

Wang, J. J., J. D. Garlich and J. C. H. Shih. 2006. Beneficial Effects of Versazyme, a Keratinase Feed Additive, on Body Weight, Feed Conversion, and Breast Yield of Broiler Chickens. **J. Appl. Poult. Res.** 15:544–550.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Williams, C.M., C.G. Lee, J.D. Garlich and J.C.H. Shih. 1991. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate as a feed protein. **Poult. Sci.** 70: 85-94.

Williams, D.C., R.M. Van Frank., W.L. Muth. and J.P. Burnett. 1982. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. **Science.** 215: 687–689.

Yamabhai, M., S. Emrat., S. Sukasem., P. Pesatcha., N. Jaruseranee. and B. Buranabanyat. 2008. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. **J. Biotechnol.** 133: 50–57.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 LB (Luria-Bertani) medium/agar

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
± Agar	15	กรัม

± appropriate concentration of Ampicillin

1.2 Low Salt Luria-Bertani medium

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
± Agar	15	กรัม

± appropriate concentration of Zeocin

1.3 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) 1 liter

yeast extract	1	เปอร์เซ็นต์
peptone	2	เปอร์เซ็นต์
dextrose (glucose)	2	เปอร์เซ็นต์
± agar	2	เปอร์เซ็นต์

± appropriate concentration of Zeocin

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol) 1 liter

yeast extract	1	เปอร์เซ็นต์
peptone	2	เปอร์เซ็นต์
dextrose (glucose)	2	เปอร์เซ็นต์
sorbitol	1	โมลาร์
± agar	2	เปอร์เซ็นต์

± appropriate concentration of Zeocin

1.5 BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)

BMMY (Buffered Methanol-complex Medium) 1 liter

yeast extract	1	เปอร์เซ็นต์			
peptone	2	เปอร์เซ็นต์			
YNB	1.34	เปอร์เซ็นต์			
Biotin	4×10^{-5}	เปอร์เซ็นต์			
glycerol	1	เปอร์เซ็นต์	หรือ methanol	0.5	เปอร์เซ็นต์

100 mM potassium phosphate, pH 6.0

± appropriate concentration of Zeocin

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีน (ดัดแปลงจาก Ferrero *et al*., 1996)

1.1 สารเคมีที่ใช้

1.1.1 สารละลายไทโรซีนมาตรฐาน ชั่งไทโรซีน 0.1 กรัม ละลายด้วยสารละลาย HCl 0.1M จนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายไทโรซีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 20 ถึง 140 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สาร A : copper sulfate 0.5 กรัม + sodium citrate 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สาร B : sodium carbonate 20 กรัม + NaOH 4 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

สาร C : สาร A 1 มิลลิลิตร + สาร B 50 มิลลิลิตร

สาร D : 1 N folin-ciocalteau (อัตราส่วนของ folin:water; 1:2, v/v)

1.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน

1.2.1 เจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีน ให้มีความเข้มข้น 20,40, 60, 80, 100, 120 และ 140 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

1.2.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง สารละลายในหลอดควบคุม และสารละลายมาตรฐานไทโรซีนลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน blank จะใช้น้ำกลั่นแทนในปฏิกิริยา

1.2.3 เติมสารละลาย C หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ลงในหัวข้อ 2.2.2 ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณ ไทโรซีน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณไทโรซีนที่มีในตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ โดยวิธี Ninhydrin (Rosen, 1957)

2.1 สารเคมีที่ใช้

2.1.1 สารละลายโซเดียมไ ซยาไนด์ (NaCN) เข้มข้น 0.01 โมลาร์ (490 มิลลิกรัมต่อลิตร)

2.1.2 สารละลายแอซิเตดบัพเฟอร์ (Acetate buffer) ละลาย 2700 กรัมโซเดียมแอซิเตด ($NaOAc.3H_2O$) ในน้ำกลั่น 2 ลิตร และเติมกรดแอซิติกล้วน (glacial HOAc) 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 7.5 ลิตร ค่าพีเอชของบัพเฟอร์ควรอยู่ในช่วง 5.3-5.4

2.1.3 สารละลายแอซีเตด-ไซยาไนด์ (Acetate-Cyanide) คือ 0.0002 โมลาร์ของโซเดียมไซยาไนด์ในสารละลายแอซีเตดบัพเฟอร์ เตรียม โดยนำส ารละลาย ในหัวข้อ 2.1.1 จำนวน 20 มิลลิลิตรมาปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยสารละลายในหัวข้อ 2.1.2

2.1.4 สารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์นินไฮดริน (Ninhydrin) ในเมทธิลเซลโลโซพ (Methyl Cellosolve or ethylene glycol monomethyl ether) เตรียมใหม่ทุกครั้งและเก็บให้พ้นแสง

2.1.5 สารละลายไอโซโพรพิวแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) และน้ำกลั่น ผสมกันในอัตราส่วนไอโซโพรพิวแอลกอฮอล์ 1:1 น้ำกลั่น

2.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

2.2.1 เติมสารละลายบัพเฟอร์ไซยาไนด์- แอซีเตต จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ในสาร ละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร (มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนในช่วง 0.2-0.4 ไมโครโมล)

2.2.2 เติมสารละลายนินไฮดรินเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.4 เมื่อครบเวลาเจือจางด้วยสารละลายผสมของไอโซโพรพานอลและน้ำ (1:1) จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง

2.2.5 ทิ้งให้อุณหภูมิลดลง จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดอะมิโนแอลลิวซีนเป็นมาตรฐาน

3. การรันเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

3.1 เตรียมอะกาโรสเจล เข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งอะกาโรส 1.2 กรัม จากนั้นเติม TBE buffer 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้ งไว้จนอุณหภูมิลดลงอยู่ระดับประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำไปเทลงบนถาดสำหรับเตรียมเจลที่มีหวี (clomb) เสียบอยู่ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวดีก่อนนำไปใช้

3.2 เอาหวีออกจากแผ่นเจล แล้วนำแผ่นเจล ไปวางบน เครื่องรันเจล จากนั้นเท 1X TBE buffer ลงไปให้ท่วมแผ่นเจลและมีระดับสูงกว่าแผ่นเจล

3.3 ผสมสารละลายดีเอ็นเอและ loading dye ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นใช้ micropipette หยอดสารผสมลงในหลุมบนแผ่นเจล

3.4 ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง แปลงไฟโดยให้ฝั่งที่หยอดดีเอ็นเอเป็นขั้วลบและฝั่งตรงข้ามเป็นขั้วบวกตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ รอจนกระทั่งสีย้อมเคลื่อนที่มาจนสุดปลายเจล จึงปิดกระแสไฟฟ้า

3.5 นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 10 นาที เมื่อครบเวลาย้ายเจลไปแช่ในน้ำดีไอโอไนซ์ 30 นาที

3.6 นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบของดีเอนเอที่เกิดขึ้นโดยส่องภายใต้แสงยูวี จากเครื่อง UV-transilluminator (Vilber Lourmat) และบันทึกภาพเก็บไว้วิเคราะห์ผลต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การเตรียมสารและวิธีวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีอิเล็กโทรฟอริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ

4.1 สารเคมีที่ใช้

4.1.1 สารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ acrylamide + 0.8 เปอร์เซ็นต์ bis-acrylamide ละลาย acrylamide 75 กรัม กับ bis-acrylamide 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร ทำการกรอง และเก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

4.1.2 สารละลาย 1.5 M Tris- HCl /SDS pH 8.8 ละลาย tris (hydroxymethyl)-aminomethane 45.41 กรัม และ SDS 1 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 8.8 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

4.1.3 สารละลาย 0.5 M Tris- HCl /SDS pH 6.8 ละลาย tris (hyd roxymethyl)-aminomethane 15.14 กรัม และ SDS 1 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 6.8 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

4.1.4 Separating gel

30% Acrylamide / 0.8% bisacry	X/3	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl /0.4% SDS (pH8.8)	2.5	มิลลิลิตร
distilled water	(7.5-X/3)	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
Total	10	มิลลิลิตร

หมายเหตุ X = gel (เปอร์เซ็นต์) ที่ต้องการเตรียม เช่น 10 เปอร์เซ็นต์ 12 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.5 Stacking gel (gel 5%)

30% Acrylamide / 0.8% bisacry	0.67	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl /0.4% SDS (pH6.8)	1	มิลลิลิตร
distilled water	2.3	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	30	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
Total	4	มิลลิลิตร

4.1.6 5X Electrophoresis buffer (เจือจางเป็น 1X ก่อนใช้)

Tris base	15.1	กรัม
Glycine	72	กรัม
SDS	5	กรัม
distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	8.4	

4.1.7 5X Sample buffer

1M Tris-HCl (pH 6.8)	0.6	มิลลิลิตร
50% Glycerol	5	มิลลิลิตร
10% SDS	2	มิลลิลิตร
β-mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
1% bromphynol blue	1	มิลลิลิตร

เวลาใช้ผสม 5X sample buffer กับตัวอย่างเอนไซม์ จนได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 1X sample buffer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.8 Staining solution

Coomassie Brilliant blue R-250	1	กรัม
Methanol	450	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
distilled water	450	มิลลิลิตร

4.1.9 Destaining solution

Methanol	100	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
distilled water	300	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : sodium dodecyl sulfate (SDS)
N,N,N′,N′-tertra methylethylene diamine (TEMED)
ในกรณีที่ทำ native-PAGE ไม่มี SDS ในทุกสูตรของสารที่ต้องเตรียม

4.2 การทำอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ

เตรียมเจลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่ ammonium persulfate 10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมก่อนใช้) และ TE MED เป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นเทเจลที่ เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น separating gel ลงไประหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น แล้วเทน้ำกลั่นปิดทับที่ผิวหน้า ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว แล้วจึงเทเจลเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น stacking gel ทับบนผิวหน้าของ separatin g gel ใส่หวีลงใน stacking gel และรอจนกระทั่ง เจลแข็งตัวดีจึงนำหวีออก จะเกิดช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างผสมกับ 5X sample buffer ในหลอดทดลอง จนได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 1X sample buffer แล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีพอตัวอย่างเย็นลงแล้ว จึงนำตัวอย่างไปหยอด ลงในช่องใส่ตัวอย่าง บนแผ่นเจล ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร และใช้ความต่างศักย์ขนาด 100 โวลต์ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จ จึงย้อมเจลโดยใช้ Staining solution (Coomassie Brilliant blue R- 250) หรือใช้ silver stain plus kit (Bio-Rad, USA) ย้อมเจลตามความเหมาะสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การศึกษาหามวลโมเลกุลของโปรตีนที่พบบนแผ่นเจล

การหามวลโมเลกุลของ โปรตีน วิธีนี้เป็นการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของ โปรตีนบนแผ่นเจล polyacrylamide กับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ และระยะทางที่แถบสี sample buffer เคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วนำมาคำนวณหาระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) ดังนี้

ระยะทางสัมพันธ์ = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่/ระยะทางที่แถบสี sample buffer เคลื่อนที่

สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานโดยที่ให้แกน X เป็นค่าระยะทางสัมพัทธ์ ส่วนแกน Y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล และกราฟที่ได้สามารถคำนวณเป็นสมการเส้นตรงได้

ดังนั้น มวลโมเลกุลของ โปรตีนหาได้จากการนำค่าระยะทางสัมพัทธ์ของ โปรตีนที่เคลื่อนที่บนแผ่นเจล polyacrylamide เดียวกับโปรตีนมาตรฐาน มาเทียบหามวลโมเลกุลกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน หรือก็คือการ นำเอาค่า relative mobility (R_f) โปรตีนที่ต้องการหามวลโมเลกุลไปแทนค่า x ในสมการเพื่อหาค่า y (y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล) จากนั้นนำ y ไปถอด log ก็จะได้มวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีเอสดีเอส-เพจ

Standard protein	molecular weight		distance	relative mobility
	kDa	log	(cm.)	(R_f)
1	210.0	5.3222	2.14	0.1842
2	125.0	5.0969	2.88	0.2478
3	101.0	5.0043	3.23	0.2780
4	56.2	4.7497	4.58	0.3941
5	35.8	4.5539	5.93	0.5103
6	29.0	4.4624	6.96	0.5990
7	21.0	4.3222	8.63	0.7427
8	6.9	3.8388	10.53	0.9062

จากนั้นนำค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐานไปเขียนกราฟตามภาพผนวกที่ ค 1 ทำให้ได้สมการเส้นตรงออกมา ให้นำเอาค่า R_f ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งเท่ากับ 0.4466 ไปแทนค่า x ในสมการเพื่อหาค่า y (y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล) จากนั้นนำค่า y ไปถอด log ก็จะได้มวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเท่ากับ 54 กิโลดาลตัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค2 มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน ส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกที่ผลิตจาก เซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* TOP10 (pFKER) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีเอสดีเอส-เพจ

Standard protein	molecular weight		distance	relative mobility
	kDa	log	(cm.)	(R_f)
1	210.0	5.3222	1.38	0.1344
2	125.0	5.0969	1.98	0.1928
3	101.0	5.0043	2.25	0.2191
4	56.2	4.7497	3.62	0.3525
5	35.8	4.5539	4.68	0.4557
6	29.0	4.4624	5.66	0.5511
7	21.0	4.3222	6.88	0.6699
8	6.9	3.8388	8.28	0.8062

จากนั้นนำค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐานไปเขียนกราฟตามภาพผนวกที่ ค 2 ทำให้ได้สมการเส้นตรงออกมา ให้นำเอาค่า R_f ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งเท่ากับ 0.3895 ไปแทนค่า x ในสมการเพื่อหาค่า y (y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล) จากนั้นนำค่า y ไปถอด log ก็จะได้มวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเท่ากับ 54 กิโลดาลตัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หามวลโมเลกุล ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ

Standard protein	molecular weight		distance	relative mobility
	kDa	log	(cm.)	(R_f)
1	250	5.3979	0.56	0.0526
2	148	5.1703	0.82	0.0771
3	98	4.9912	1.59	0.1494
4	64	4.8062	2.33	0.2190
5	50	4.6990	3.31	0.3111
6	36	4.5563	4.55	0.4276
7	22	4.3424	6.48	0.6090
8	16	4.2041	7.06	0.6635
9	6	3.7782	8.65	0.8130

จากนั้นนำค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐานไป เขียนกราฟตามภาพผนวกที่ ค3 ทำให้ได้สมการเส้นตรงออกมา ให้นำเอาค่า R_f ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งเท่ากับ 0.3628 ไปแทนค่า x ในสมการเพื่อหาค่า y (y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล) จากนั้นนำค่า y ไปถอด log ก็จะได้มวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเท่ากับ 47 กิโลดาลตัน

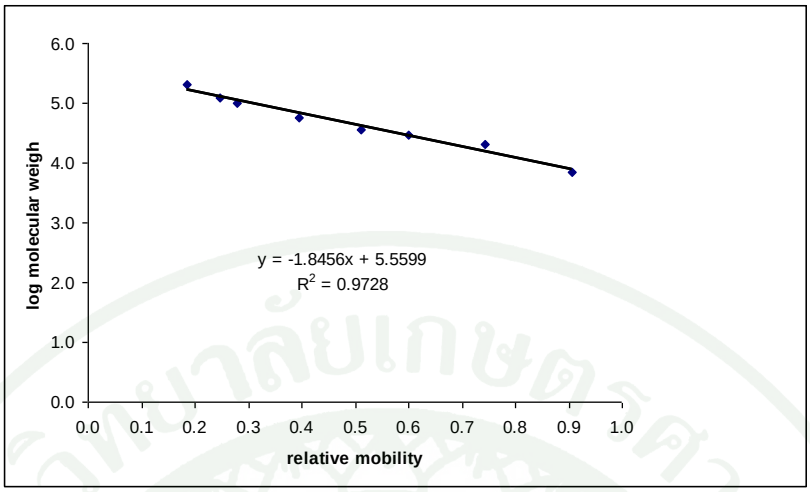
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค4 มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้หามวลโมเลกุล ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2) ที่พบบนแผ่นเจลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเอสดีเอส-เพจ

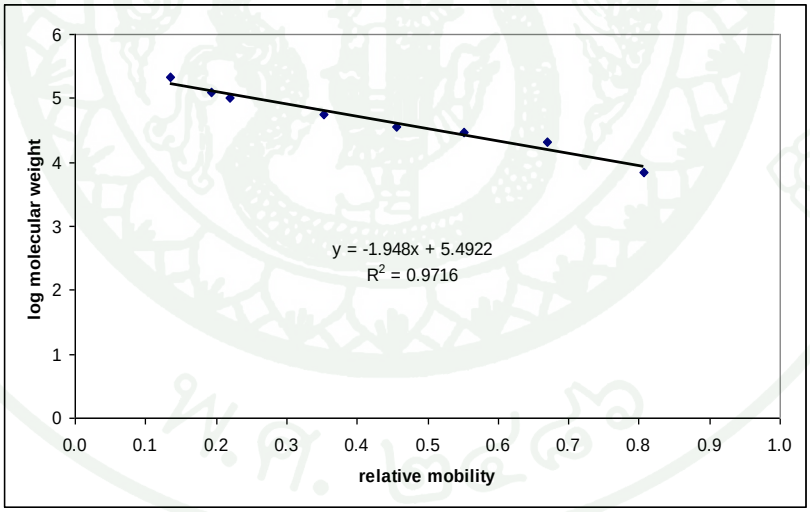
Standard protein	molecular weight		distance	relative mobility
	kDa	log	(cm.)	(R_f)
1	250	5.3979	0.64	0.0600
2	148	5.1703	0.90	0.0844
3	98	4.9912	1.67	0.1567
4	64	4.8062	2.41	0.2261
5	50	4.6990	3.33	0.3124
6	36	4.5563	4.55	0.4268
7	22	4.3424	6.56	0.6154
8	16	4.2041	7.25	0.6801
9	6	3.7782	8.86	0.8311

จากนั้นนำค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐานไป เขียนกราฟตามภาพผนวกที่ ค4 ทำให้ได้สมการเส้นตรงออกมา ให้นำเอาค่า R_f ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งเท่ากับ 0.3696 ไปแทนค่า x ในสมการเพื่อหาค่า y (y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล) จากนั้นนำค่า y ไปถอด log ก็จะได้มวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเท่ากับ 47 กิโลดาลตัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

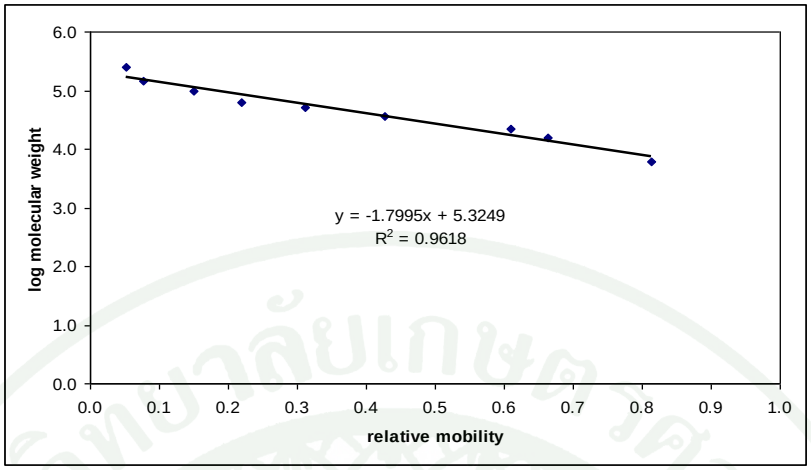


ภาพผนวกที่ ค1 กราฟแสดงค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐานที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* Rosetta (pFKER)

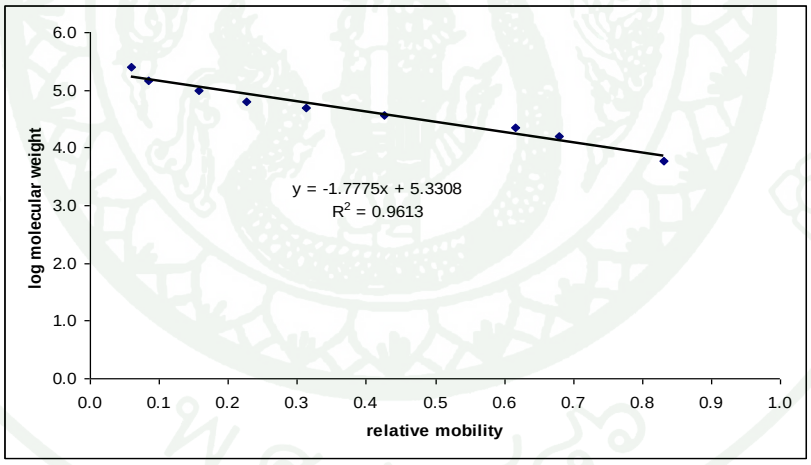


ภาพผนวกที่ ค2 กราฟแสดงค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตก ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Escherichia coli* TOP10 (pFKER)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ค3 กราฟแสดงค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-1)



ภาพผนวกที่ ค4 กราฟแสดงค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลโปรตีนมาตฐาน ที่ใช้หามวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม *Pichia pastoris* Y11430 (pPKER-2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายเจนวิชญ์ พฤฑฒิกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 มกราคม 2523
สถานที่เกิด	อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (จุลชีววิทยา) สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	–
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	–
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัยเรื่อง Construction of recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing keratinase ในงาน International Conference of Thai Society for Biotechnology
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ 2552

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์