ผลการวิจัย (Result)

1. การ สร้าง fusion protein ของ *mcsA* จาก *S. aureus* strain SH1000 กับ histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33)จาก *S. aureus* strain ATCC12600 ใน แบคทีเรีย *Escherichia coli*

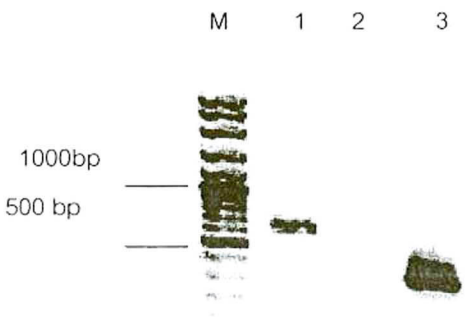
1.1 ยีน *mcsA* จาก *S. aureus* ที่มี cysteine rich metal binding domain อยู่ 4 domain ได้ถูก clone โดยใช้ oligonucleotide primers mcsA-F1 และ mcsA-B1โดยสังเคราะห์ให้มี restriction site *Bam*HI site ที่ปลาย 5' end และ *Hind*III site ที่ปลาย 3' ของ DNA fragment (GCGGATCCGGTGCTTTGTGAAAATTGT CAACTTAA และ GCAAGCTTTTATGC GTCATCATGTTGCAC) การทำ PCR จะใช้ *S. aureus* genomic DNA strain SH1000 เป็น template ได้ PCR product ขนาด 567 bp ตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 1 เลนที่ 1 จากนั้น PCR product จะถูกตัดด้วย restriction enzyme *HindIII* เก็บไว้ที่ 4 °C

1.2 ทำ PCR ส่วน histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33)จาก *S. aureus* strain ATCC12600 โดยใช้ oligonucleotide primers His-F1 และ His-B1 โดยสังเคราะห์ให้มี restriction site *Hind*III site ที่ปลาย 5' end และ *EcoRI* site ที่ปลาย 3' ของ DNA fragment (GAAGCTTATGGAGCATCATAGTCAT CAAGAAC และ GCGAATTCAGCCCCTGATAAAAATGGCTT) การทำ PCR จะใช้ *S. aureus* genomic DNA strain ATCC12600 เป็น template ได้ PCR product ขนาด 221 bp ตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 1 เลนที่ 3 จากนั้น PCR product จะถูกตัดด้วย restriction enzyme *HindIII* เก็บไว้ที่ 4 °C

11 ก.ค. 2555
213960

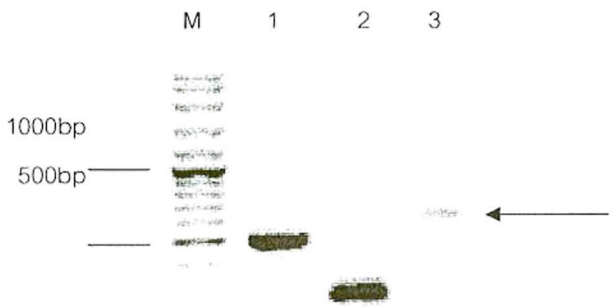
1.3 ทำ ligation PCR ส่วน McsA fragment (size 520 bp)กับ PCR ส่วน histidine-rich metal binding domain (size 748 bp) จากนั้นทำ PCR โดยใช้ oligonucleotide primers mctsR-F1 และ His-B1 โดยใช้ ligation product เป็น template (รูปที่ 2) ผล PCR ของ fusion gene ได้ PCR product ขนาดประมาณ 750 bp ตามที่ต้องการ ดังแสดงดังรูปที่ 3 จากนั้น PCR product ของ fusion gene fragment จะถูก cloned ใน PCR vector (Invitrogen) คัดเลือกโคลนที่มี fusion gene โดยการทำ PCR โดยใช้ primer mcsA-F1 และ His-B1 จากนั้นส่ง positive clone ทำ DNA sequencing เพื่อเช็ค Open reading fram ของ fusion gene

1.4 นำ plasmid TA ที่มี fusion gene มาตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำไป subclone ใน pRSETa โดยใช้*Bam*HI และ *Hind*III sites แล้วนำไปใส่ใน *E.coli* strain JM109 จากนั้นคัดเลือก positive clone โดยการทำ colony PCR และ plasmid ที่แยกได้จาก positive clone ของ *E.coli* strain JM109 จะถูก transformed ใน แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) PLysS (Novagen) พร้อมกับคัดเลือก positive clone โดยการทำ colony PCR อีกครั้งและ คัดเลือกหา clone ที่มีการ express protein ออกมาในขนาดที่ต้องการ



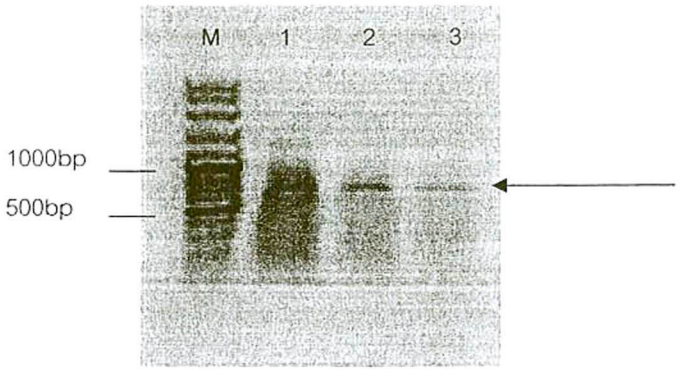
รูปที่ 1 PCR product ยีน *mcsA*

PCR product ของ *mcsA* (527 bp) และ histidine-rich metal binding domain (221 bp) และตรวจดูโดยใช้ 1% agarose gel eletrophorsis. LaneM ได้แก่ DNA maker, Lane1 คือ PCR product ของ *mctsRa*. ยีน Lane2 ได้แก่ negative control with no DNA template ของ mctsRa gene Lane3 คือ PCR product ของ histidine-rich metal binding domain Lane4 ได้แก่ negative control with no DNA template ของ histidine-rich metal binding domain



รูปที่ 2 ligation product **ที่ได้จากการต่อ** *mcsA* **และ** histidine-rich metal binding domain

ligation product ขนาด 750 bp ที่ได้จากการต่อ *mctsRa* และ histidine-rich metal binding domain ตรวจดูโดยใช้ 1% agarose gel eletrophorsis. LaneM ได้แก่ DNA maker, Lane1 คือ PCR product ของ *mcsA* ยีน Lane2 ได้แก่ PCR product ของ histidine-rich metal binding domain Lane 3 ได้แก่ ligation product ที่ได้จากการต่อ *mctsRa* และ histidine-rich metal binding domain (ลูกศรชี้)



รูปที่ 3 PCR product fusion gene *mcsA* และ histidine-rich metal binding domain

PCR product ของ fusion gene *mcsA* (527 bp) และ histidine-rich metal binding domain (221 bp) โดยใช้ ligation product ที่ได้จากการต่อ *mctsRa* และ histidine-rich metal binding domain และตรวจดูโดยใช้ 1% agarose gel eletrophorsis. LaneM ได้แก่ DNA maker, Lane1,23 คือ PCR product ของ fusion gene *mcsA* และ histidine-rich metal binding domain (750 bp) clone 1,2, 3(ลูกศรชี้)

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ metal binding domain **และ**His rich domain **จาก** *S. aureus* **ในแบคทีเรีย** *Escherichia coli*

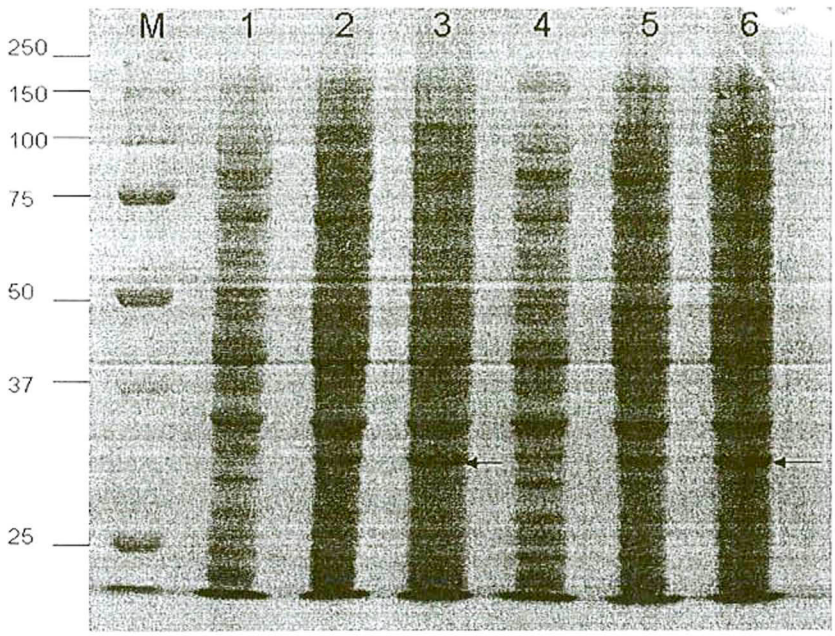
2.1 คัดเลือก clone ที่มีการผลิต fusion โปรตีนของ metal binding domain จาก *S. aureus* ในแบคทีเรีย *Escherichia coli*

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 ug/ml และ chloramphenicol 10 ug/ml จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ ข้ามคืนที่ 25 °C เก็บ 1 ml ของ culture ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะนำมาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet เติม 1X SDS-sample buffer ต้ม 5 นาทีและนำ ตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 clone ที่นำมาศึกษา มีการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 30 Kda ตรงตามขนาดของ fusion protein (รูปที่ 4ลูกศรชี้) โดยโปรตีนที่สร้างขึ้นจะมีการสร้างออกมามากหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียข้ามคืนที่ 25 °C

2.2 ศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli*

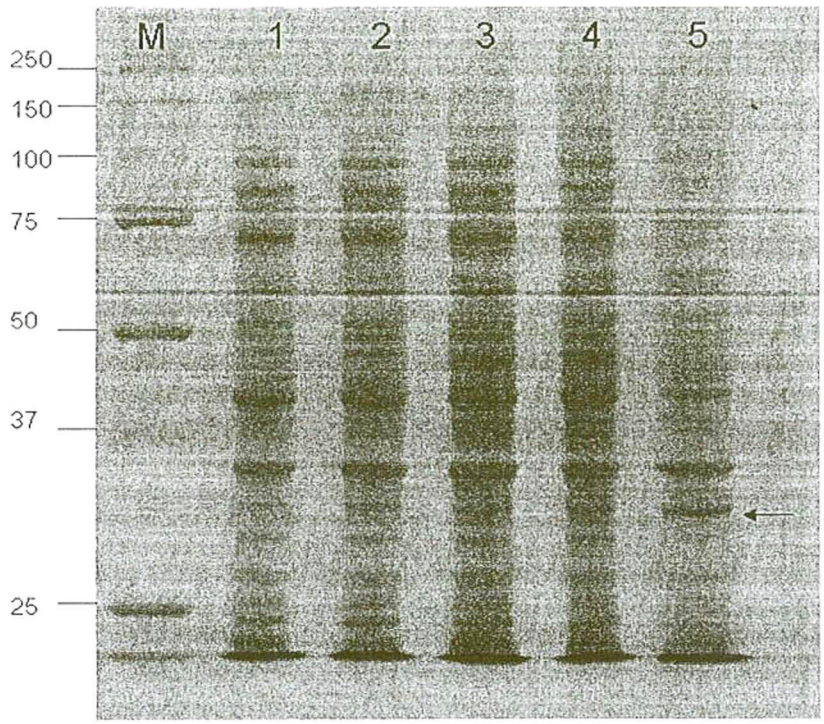
แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 ug/ml และ chloramphenicol 10 ug/ml จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลที่ 37 °C เก็บ 1 ml ของ culture ที่ 1.5, 3, 4.5 ช.ม. และ ข้ามคืน

จากนั้น ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะนำมาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet buffer ต้ม 5 นาทีและนำตัวอย่างโปรตีนไป run SDS-PAGE โดยใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue ผลดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าที่ 1.5, 3, 4.5 ช.ม. ชักนำให้มีการสร้างโปรตีนในปริมาณน้อยโดยมีสภาวะที่ดีที่สุดในการชักนำให้มีการสร้างโปรตีนที่การบ่มข้ามคืนที่ 25 ^{o}C (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 SDS-PAGE analysis **ของการคัดเลือก** Clone **ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ** fusion metal binding domain **และ**His rich domain **จาก** *S. aureus* **ในแบคทีเรีย** *Escherichia coli*

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB brothจนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ซ.ม. และ 25 °C ข้ามคืน แล้ว นำ 1 ml ของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลามาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet ใส่ 1X SDS-sample buffer ต้ม 5 นาทีและนำ ตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue Lane M, molecular weight marker; lane 1, *E. coli* uninduced extract control (ก่อนเติม IPTG) ของโคลนที่ 1 ; lane 2, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 4 ชั่วโมง ของโคลนที่ 1; lane 3, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 25 °C ข้ามคืน ของโคลนที่ 1; lane 4, *E. coli* uninduced extract control (ก่อนเติม IPTG) ของโคลนที่ 2 ; lane 5, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 4 ชั่วโมง ของโคลนที่ 2; lane 6, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 25 °C ข้ามคืน ของโคลนที่ 1
ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพ (M) คือ molecular weight masses (kDa).

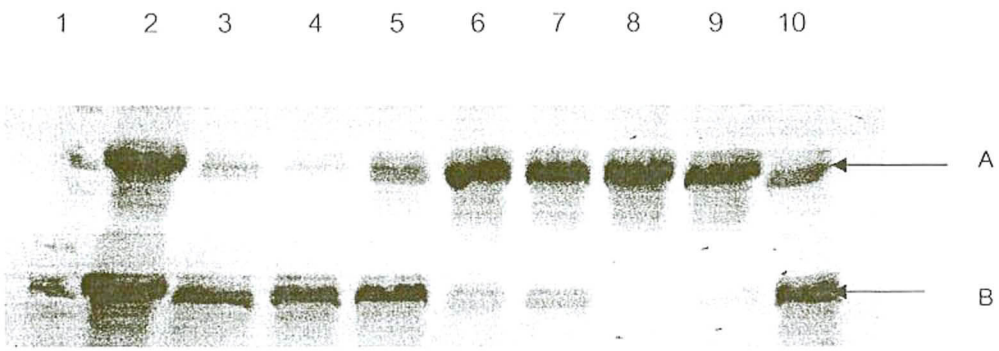


รูปที่ 5 SDS-PAGE analysis **ของการสร้างโปรตีน** fusion metal binding domain **และ** His rich domain **จาก** *S. aureus* **ในช่วงเวลาต่าง ๆ**

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB brothจนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีน โดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลที่ 37 ^{o}C เก็บ 1 ml ของ culture ที่ 1.5, 3, 4.5 ช.ม. และ ข้ามคืน จากนั้น ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะนำมาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet ใส่ 1X SDS-sample buffer ต้ม 5 นาทีและนำ ตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue Lane M, molecular weight marker; lane 1, *E. coli* uninduced extract control (ก่อนเติม IPTG) ; lane 2, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 1.5 ช.ม. ; lane 3, . *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 3 ช.ม. lane 4. *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 4.5 ช.ม. lane 5. *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce ข้ามคืน ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพคือ molecular weight masses (kDa).

3. **การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนทท์โปรตีน** metal binding domain

เมื่อนำรีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain protein มาทดสอบการจับกับโลหะหนัก $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$ และ $Pb(NO_2)_3$ โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography ผลพบว่า protein มีการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} และ Co^{2+} โดยพบโปรตีนหลุดออกมาในขั้นตอนสุดท้ายหลังจาก elute ไล่ออกมาจากคอลัมภ์โดยใช้ EDTA (รูปที่ 6A) มีส่วนน้อยที่หลุดออกมาในส่วนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก อาจจะเป็นเพราะว่าประสิทธิภาพในการจับกับโลหะหนักไม่ค่อยดีหรืออาจจะเป็นเพราะว่าปริมาณโปรตีนมากเกินไป. ในส่วนของ Fe^{3+}, Mn^{2+} และ Pb^{2+} ไม่พบมีการจับกับ protein โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะหลุดออกมาในขั้นตอนการล้าง column ดังรูปที่ 6B



รูปที่ 6 SDS-PAGE analysis **ของ** recombinant metal binding protein **ในการจับกับโลหะหนัก**

Recombinant metal binding protein (ลูกศรชี้) จะถูกทดสอบคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักโดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography และนำตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (15%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue A. bound protein;B: unbound protein; Lane 1: molecular weight marker, lane 2: Control (protein ที่ไม่ถูกทดสอบการจับกับโลหะหนัก) , lane 3: $CuCl_2$, lane 4: $ZnCl_2$, lane 5: $CdCl_2$, lane 6: $Pb(NO_2)_3$, lane 7: $FeCl_2$, lane 8: $MgCl_2$, lane 9: $MnCl_2$, lane 10: $CoCl_2$. ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพคือ molecular weight masses (kDa).

4. **ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของ** recombinant metal binding protein **ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักเทียบกับ** total protein **ของ** *E. coli* BLR(DE3)

E. coli BLR(DE3) ที่มี pRset ที่มีการแสดงออกของ recombinant metal binding protein จะถูกเลี้ยงใน LB (1000 ml) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol จนกระทั่ง OD600 เท่ากับ 0.5 จากนั้นเซลแบคทีเรียจะถูก induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM และเลี้ยงเซลต่อเป็นเวลา 3 ช.ม. แบคทีเรียที่ถูก induced จะถูกเก็บและล้างด้วย 20 mM Tris-HCl ที่มี 145 mM NaCl จากนั้นเซลแบคทีเรียจะ resuspended ใน 1 ml 40 mM imidazole, 0.4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mg/ml lysozyme และ 200 μM PMSF. Cell suspensions จะถูกนำไป Cell suspensions จะถูกนำไป เติม DNaseI (1 μg/ml) และ Triton-X (1%) จากนั้น Cell suspensions จะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C เพื่อกำจัด Cell debris และ unbroken cells จากนั้นเก็บ supernatant ไปทดสอบการจับกับโลหะหนักโดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography ปริมาณโปรตีนจะถูกวัดใน supernatant ก่อนการทดสอบการจับกับโลหะหนักและในโปรตีนที่ได้จากช่วงการล้างด้วย EDTA หลังการทดสอบการจับกับโลหะหนักพบว่าเปอร์เซ็นต์ของ recombinant metal binding protein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะ Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2}, Co^{2+} เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ *E. coli* BLR(DE3) เท่ากับ 3.53 %, 4.63 %, 3.86 % และ 3.33 % ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของ recombinant metal binding protein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักเทียบกับ total protein ของ *E. coli* BLR(DE3)

Fraction	Total Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Protein (mg)	% total protein
Total protein	0.71	2.82	2	100%
MBP-$CdCl_2$	0.05	1.54	0.077	3.86%
MBP-$CoCl_2$	0.05	1.32	0.066	3.30%
MBP-$CuCl_2$	0.05	1.41	0.07	3.53%
MBP-$ZnCl_2$	0.05	1.85	0.092	4.63%

5. **สภาวะที่มีผลต่อการจับของโลหะหนักกับ** recombinant metal binding protein

5.1 **ปริมาณโปรตีน**

รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain ปริมาณ 25, 50, 100 และ 150 µg จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography พบว่าปริมาณโปรตีนในช่วง 25-150 µg สามารถจับกับโลหะได้หมด

5.2 **อุณหภูมิ**

รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก CuCl2, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography โดยขณะที่ทดสอบการจับของโปรตีนกับโลหะหนักจะทำการบ่มโปรตีนและโลหะหนักไว้ที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้

5.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

5.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 10 นาที

5.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นคอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักและไม่จับกับโลหะหนักต่อไปผลพบว่าที่อุณภูมิ 37 °C และ 45 °C ไม่มีผลต่อการจับของโปรตีนกับโลหะหนักแต่ที่อุณหภูมิ 65°C ประสิทธิภาพในการจับของโปรตีนกับโลหะ $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$ ลดลง (ดังแสดงในตารางที่ 4)

5.3 pH

รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography โดย

ขณะที่ทดสอบการจับของโปรตีนกับโลหะหนักจะทำการบ่มโปรตีนและโลหะไว้ที่ อุณภูมิห้อง แต่ pH ต่างกันดังนี้

3.1.1 บ่มที่ pH 3 เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2 บ่มที่ pH 5 เป็นเวลา 10 นาที

3.1.3 บ่มที่ pH 7 เป็นเวลา 10 นาที

3.1.4 บ่มที่ pH 9 เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นคอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักและไม่จับกับโลหะหนักต่อไปผลพบว่า pH ไม่มีผลต่อการจับของโปรตีนกับโลหะหนัก (ดังแสดงในตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงผลของปริมาณโปรตีนต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

Protein contain	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
150 µg	+	+	+	+
100 µg	+	+	+	+
50 µg	+	+	+	+
25 µg	+	+	+	+

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

ตารางที่ 5 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

Temp.	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
37°C	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+
65°C	-	-	+	-

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

ตารางที่ 6 แสดงผลของ pH ต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

pH	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
3	+	+	+	+
5	+	+	+	+
7	+	+	+	+
9	+	+	+	+

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

6. **ความคงทน** (stability) **ของ** recombinant metal binding protein

ในการศึกษาครั้งนี้รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain ที่ได้จะถูกนำไปทดสอบในสภาวะต่างๆ ได้แก่

4.1) ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆได้แก่ 25°C , 37 °C , 45°C , 65 °C และ 85 °C เป็นเวลา 10 นาที (thermal stability testing) จากนั้นรีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain จากนั้นจึงนำไปใช้ในการศึกษาการจับกับโลหะหนักด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2 ผลพบว่า รีคอมบิโแนทท์ปรตีน metal binding domain ที่อุณหภูมิ 25°C และ 37 °C โปรตีนสามารถจับกับโลหะหนักได้ทั้ง 4 ชนิด ส่วนที่ 45°C พบว่ารีคอมบิแนทท์โปรตีนไม่สามารถจับได้กับ cobolt แต่สามารถจับได้กับ copper , cadmium และ zinc C ส่วนที่ 65°C และ 85°C พบว่ารีคอมบิแนทท์โปรตีนไม่สามารถจับได้กับ cobolt และ cadmium แต่สามารถจับได้กับ copper และ zinc (ดังแสดงในตารางที่ 7) โดยคุณสมบัติของการจับโลหะหนักทั้ง 2 ชนิดยังคงอยู่แม้ treat โปรตีนที่ 85°C เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 7 แสดงผลความคงทนต่ออุณหภูมิ (thermal stability) ของ recombinant metal binding protein

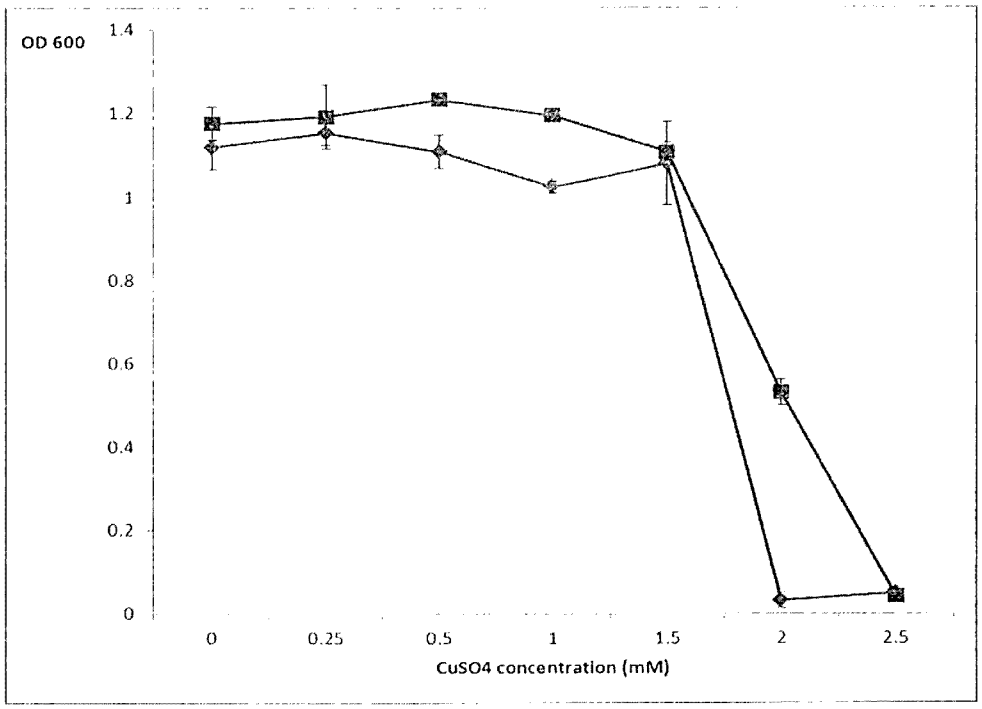
Temp.	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
25°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+
45°C	+	-	+	+
65°C	-	-	+	+
85°C	-	-	+	+
85°C, 30 min	-	-	+	+

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

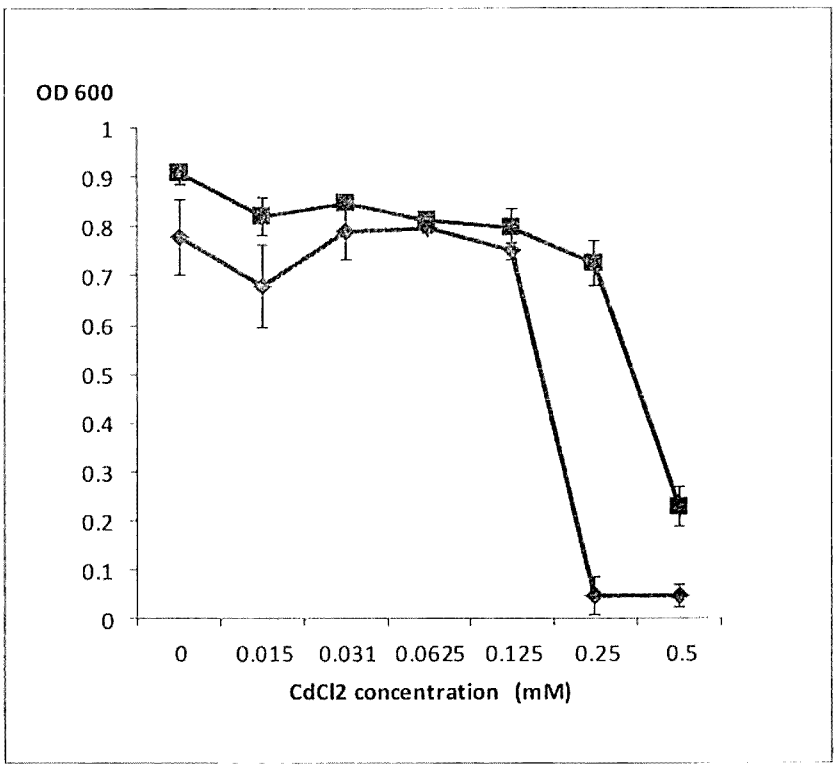
7. Growth curve แสดงการเจริญ ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif ในสภาวะที่มีโลหะหนัก

เพื่อทดสอบว่าการมีโปรตีน heavy metal binding domain แสดงออกในเซลมีผลต่อความทนของเชื้อต่อโลหะหนักทำโดยการศึกษาการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่มี pRset ที่มีการแสดงออกของโปรตีน heavy metal binding domain เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีแต่ pRset (control) ในสภาวะที่มีโลหะหนักชนิด $CuSO_4$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ควบคุมที่มีแต่ pRset เจริญเติบโตช้ากว่า*E. coli* สายพันธุ์ ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif ในสภาวะที่มี $CuSO_4$ ความเข้มข้น 2.5 mM (รูปที่ 7) ในสภาวะที่มี $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM (รูปที่ 8) แต่ไม่พบความแตกต่างของการเจริญของ *E. coli* ในสภาวะที่มีโลหะหนัก $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ (รูปที่ 9 และ 10)



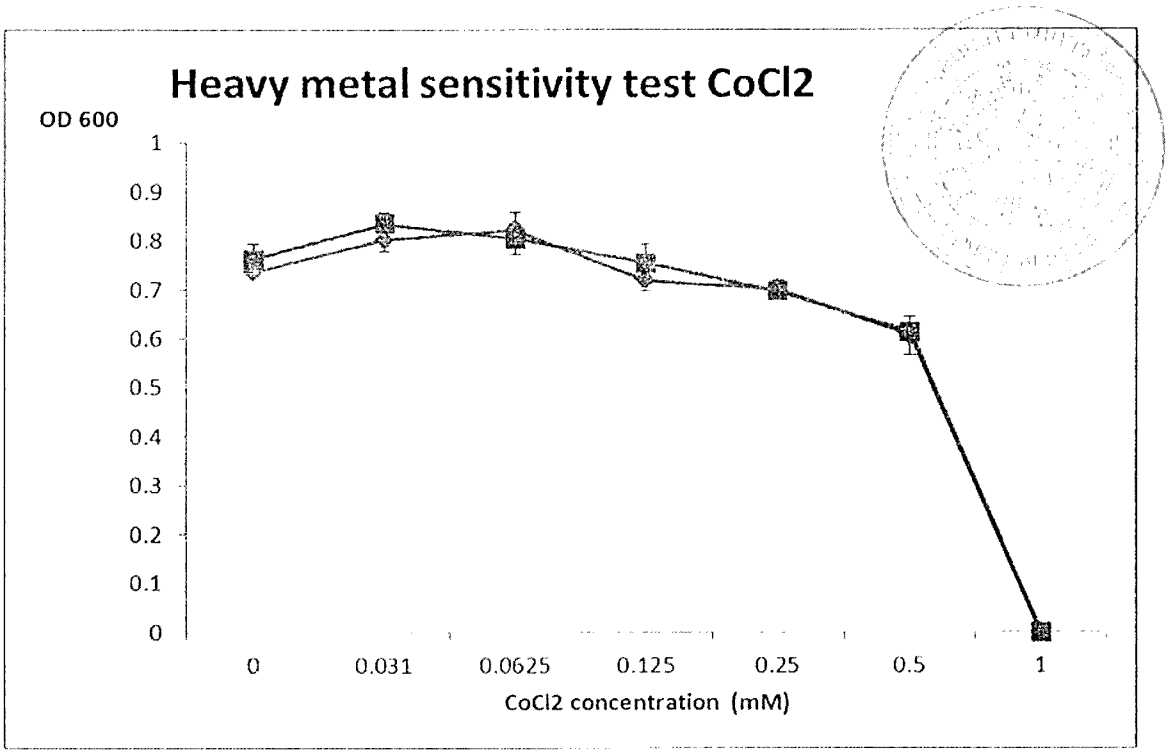
รูปที่ 7 ผลของโลหะหนัก $CuSO_4$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ *pRset* (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth *ที่มี* ampicillin 50 µg/ml *และ* 0.1 mM IPTG และโลหะหนัก $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{o}C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ *spectrophotometer* ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า $\pm$ SD ของสามการทดลอง



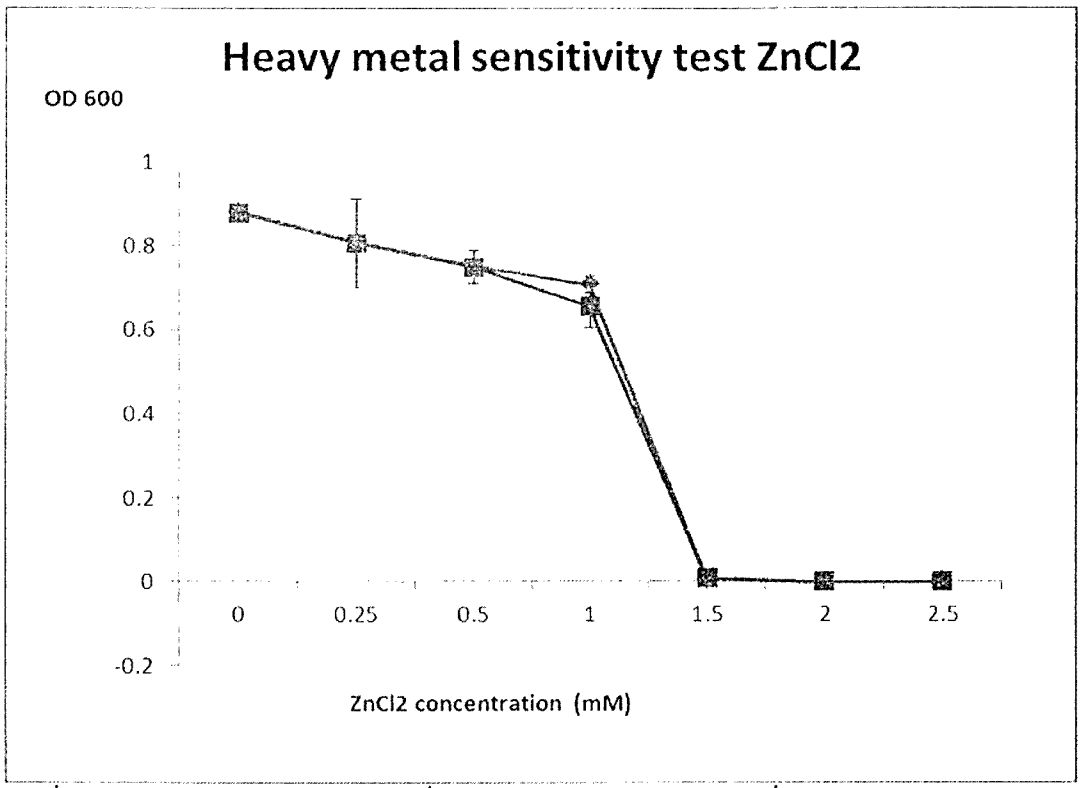
รูปที่ 8 ผลของโลหะหนัก $CdCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth *ที่มี* ampicillin 50 µg/ml *และ* 0.1 mM IPTG และ $CdCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 ^{o}C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า $\pm$ SD ของสามการทดลอง



รูปที่ 9 ผลของโลหะหนัก $CoCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และ $CoCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า $\pm$ SD ของสามการทดลอง



รูปที่ 10 **ผลของโลหะหนัก** $ZnCl_2$ **ที่มีต่อการเจริญของ** *E. coli* **ที่มีการ** expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth *ที่มี* ampicillin 50 µg/ml *และ* 0.1 mM IPTG และ $ZnCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า ± SD ของสามการทดลอง