วิธีดำเนินการวิจัย (Material and Method)

1) สายพันธ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธ์แบคทีเรียที่ใช้ครั้งนี้คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109, DH5α และ BL21 (DE3) PLysS และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC12600 และ SH1000 (ตารางที่ 1) โดย *E. coli* จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria- Bertani broth (LB) และ *S. aureus* ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase-Soy –broth (TSB)

2) cloning and overexpression ของ metal binding domain จาก *S. aureus* ในแบคทีเรีย *E. coli*

2.1 Cloning ของ metal binding domain จาก *S. aureus* ในแบคทีเรีย *E. coli*

สร้าง primer ที่จำเพาะกับส่วน heavy metal binding domain จาก histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33) ของยีน copper-transporting ATPase จากแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธ์ ATCC 12600 และ cysteine rich- metal binding domain (amino acid 1-86) ของยีน copper-transporting ATPase จากแบคทีเรีย *S. aureus*สายพันธ์ SH1000 (ตารางที่ 1) จากนั้นชิ้นส่วนของยีนทั้งสองส่วนจะถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCRโดยใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วน heavy metal binding domain และชิ้นส่วนยีนทั้งสองจะถูกนำมาต่อกันโดยใช้เอ็นไซม์ ligase จากนั้นทำการ clone ชิ้นส่วนของยีน heavy metal binding domain ที่ต่อกันใน PCR2.1 vector และ subclone ใน pRSETa จากนั้น plasmid ที่มีชิ้นส่วนของยีน heavy metal binding domain จะถูก transformed ใน *E. coli* BL21 (DE3) PLysS (Novagen).

ตารางที่ 1 สายพันธ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธ์แบคทีเรีย	ลักษณะ	แหล่งที่มา
S. aureus strains		
SH1000	NCTC 8325-4 with rsbU mutation repair	Horsburgh *et al.*, 2002
ATCC 12600	a laboratory strain of *S. aureus*	Kakudo *et al.*, 1992
E. coli strains		
JM109	*rec* A1 *sup*E44*endA*1*hsdR17 gyrA96 relA1*	Promega
	*thi*Δ (*lac-proAB*) F' (*traD36proAB*+ *lacIQ Z* Δ M15)	
BL21(DE3)	(pLyS) F- *ompT hsdSB(rB-m-B) gal dcm*	Promega
Plasmids		
TA vector	PCR cloning vector, Amp^r	RBC biosciences, Taiwan
pRSETa	Overexpression vector, Amp^r	Invitrogen

ตารางที่ 2. Primers ที่ใช้ในการศึกษา

gene	Primer name	Primer sequence 5'-3'
mcsa	Mcsa-F (*Bam*HI)	GCGGATCCGGTGCTTTGTGAAAATTGT CAACTTAA
	Mcsa-B (*Hind*III)	GCAAGCTTTTATGC GTCATCATGTTGCAC
copA	His-F(*Hind*III)	GAAGCTTATGGAGCATCATAGTCAT CAAGAAC
	His-B(EcoRI)	GCGAATTCAGCCCCTGATAAAAATGGCTT

- The restriction sites are indicated by underline

2.2 **การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ** heavy metal binding domain metal binding domain **จาก** *S. aureus* **ใน** *E. coli*

ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ heavy metal binding domain ใน *E. coli* แบคทีเรียจะถูกเลี้ยงใน LB ที่มี ampicillin และ chloramphenicol ที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่ง OD_{600} ถึง 0.5 จากนั้นเติม IPTGให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.0 mM และเลี้ยงเซลเป็นเวลา 3 ช.ม. หลังจากนั้นเซลจะถูกปั่นเก็บ ล้างด้วย lysis buffer ที่เย็น(20mM Tris, pH 7.4 containing 145 mM NaCl) และ Pelletsจะถูกทำให้แตกโดยใช้ sonicator (Branson Sonifier 450) และ cell debris จะถูกแยกออกโดย centrifugation ที่ 10,000Xg ที่ 4 °C. supernatants จะนำไป แยกโปรตีนโดยใช้ nickel-charged agarose affinity columns (Novagen) และ eluted โปรตีนออกมาด้วย 200-400 mM imidazole แต่ละ fractions ของโปรตีน จะถูกนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford assay และ 12.5 % SDS-PAGE Fractions ที่มี โปรตีนจะถูกนำมา รวมกันและ dialyzed ด้วย 25 mM Tris, pH 8.0 ที่มี 100 mM sucrose, 50 mM NaCl และ 1 mM DTT. ปริมาณโปรตีนจะถูกหาโดยวิธี Bradford assay ก่อนนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

3 **การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนทท์โปรตีน** metal binding domain **และ** *E.coli* crude extract **ที่มี** metal binding domain fusion protein**โดยใช้** iminodiacetic acid-agarose chromatography.

Iminodiacetic acid-agarose คอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ถูก equilibrated กับโลหะหนักชนิดต่างๆที่ต้องการทดสอบจะถูกนำมาใช้ในการศึกษา ความสามารถในการจับของ heavy metal binding protein กับโลหะหนักตามวิธีของ Lutsenko และคณะ (1997). วิธีการคือคอลัมน์จะ

ถูกบรรจุด้วย iminodiacetic acid-agarose (Sigma) 100 μl และล้างด้วย 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) จากนั้นคอลัมน์จะถูก equilibrated ด้วยสารละลายของโลหะหนักชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 mM ($CdCl_2$, $CuCl_2$, $CoCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$ และ $FeCl_3$) ใน 50 mM sodium phosphate buffer ปริมาตร 10 เท่าของ iminodiacetic acid-agarose และคอลัมน์จะถูกล้างด้วย sodium phosphate buffer เพื่อกำจัด metal ions ที่มากเกิน จากนั้น purified heavy metal binding proteinปริมาณ 100 μg หรือ 1 mg ของ *E.coli* crude extract จะถูกนำมาใส่ในคอลัมน์และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที คอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก จากนั้นคอลัมน์จะถูกล้างด้วย 500 μl sodium phosphate buffer และ เก็บโปรตีนที่มีการจับกับโลหะหนักโดยการชะล้างโปรตีนออกมาโดยใช้ 50 mM EDTA ใน sodium phosphate buffer ปริมาตร 100 μl ตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากช่วงการล้างด้วย EDTA และช่วงที่เก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก (unbound) จะถูกนำไปเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ vacuum centrifuge และนำมาวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE. ปริมาณ total protein ใน crude extract และ โปรตีนที่มีการจับกับโลหะหนักกับปริมาณโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักจะวัดโดยใช้ชุดวัดโปรตีน (Bio-Rad)

4. **การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนทท์โปรตีน** metal binding domain **ของโปรตีน ในสภาวะต่าง ๆ**

ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาการจับของรีคอมบิแนส์โปรตีน metal binding domain กับโลหะหนัก ชนิด $CuSO_4$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ ในสภาวะต่างๆ โดยเตรียมคอลัมน์ที่ถูก

equilibrated ด้วยสารละลายของโลหะหนักชนิดต่างๆ จากนั้น รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain 100 µg จะนำมาทดสอบกับโลหะหนักในสภาวะต่างๆ ได้แก่

1) ความร้อนที่ 37°C , 45°C , 65 °C เป็นเวลา 10 นาที (thermal stability testing)

2) สารละลายที่มี pH ต่างๆ ได้แก่ pH 3,5,7,9 เป็นเวลา 10นาที

จากนั้นตรวจการจับกับโลหะหนักด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2

5. **ความคงทน (stability) ต่ออุณหภูมิของ** recombinant metal binding protein

ในการศึกษาความคงทน (stability) ต่ออุณหภูมิที่มีผลต่อการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนส์โปรตีน metal binding domain โปรตีนจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนนำไปทดสอบการจับกับโลหะหนักชนิด $CuSO_4$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ ด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2

6. **การศึกษาผลของโลหะหนักที่มีต่อการเจริญของ** *E. coli* **ที่มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ** heavy metal binding domain metal binding domain

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ heavy metal binding domain metal binding domain และแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีแต่ plasmid pRSETa มาปรับความขุ่นที่ OD_{600} ให้เท่ากับ 0.1 แล้วนำ 100 µl ไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และโลหะหนักชนิดต่างๆได้แก่ CuCl2, CdCl2, ZnCl2 และ CoCl2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer