

บทคัดย่อ

โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโลหะหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อนำไปกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม โปรตีนที่มี CXXC motif เป็นโปรตีนโดเมนที่สามารถจับกับโลหะหนักได้หลายชนิด และพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนและ overexpressed โปรตีนที่มี CXXC motif ที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนักจาก *mcsA* gene ของ *S. aureus* ใน *Escherichia coli* และศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในสภาวะต่าง ๆ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้โปรตีนหรือเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนในการกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนที่มี CXXC motif มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนัก Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} การศึกษาความคงทนของโปรตีนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 37 °C, 45 °C, 65 °C และ 85 °C ที่มีผลต่อการจับโลหะหนักพบว่าโปรตีนยังมีความสามารถในการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} หลังจากบ่มโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 30 นาที การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลระหว่างการจับของโปรตีนกับโลหะหนักพบว่าที่อุณหภูมิ 65 °C โปรตีนสามารถจับกับโลหะ Cu^{2+} แต่ไม่สามารถจับกับโลหะ Cd^{2+} , Co^{2+} และ Zn^{2+} ได้ขณะที่ pH 3-7 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการจับกับโลหะหนักของโปรตีน เซลล์ *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่มี CXXC motif พบมีความทนต่อโลหะหนัก $CuSO_4$ และ $CdCl_2$ เพิ่มขึ้น ผลจากการศึกษารังนี้แสดงว่าโปรตีนที่มี metal binding domain (CxxC motif) มีความสามารถกับการจับโลหะหนักได้หลายชนิดและคุณสมบัติในการจับโลหะหนักมีความทนต่อสภาวะแวดล้อมเช่น pH และอุณหภูมิ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนไปใช้ในการศึกษาเพื่อกำจัดโลหะหนัก ต่อไปในอนาคต

Abstract

A number of heavy metal-binding protein in microorganisms has been used to study bioremediation. CxxC motif metal binding domain is the protein that contained Cys-X-X-Cys motif which are capable to bind various type of heavy metals. We have cloned and overexpressed the heavy metal binding domain CxxC motif recombinant protein from *mcsA* gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. We study the factors involving the metal binding activity in different condition in order to analyze the potential of the recombinant protein for bioremediation. The recombinant protein can bound to Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} . Thermal stability of the recombinant protein was tested at 37 °C, 45 °C, 65 °C and 85 °C. The results shown that the metal binding activity to Cu^{2+} and Zn^{2+} still present after treatment the protein at 85 °C for 30 min. Temperature and pH that affect the metal binding activity was tested and the results showed that recombinant protein bound to Cu^{2+} at 65 °C whereas the pH 3-7 do not affect the metal binding. *E. coli* harboring pRset with heavy metal binding domain CXXC motif increased heavy metal resistance against CuSO_4 and CdCl_2 . The results from our study shown that metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein can bind effectively to various types of heavy metals and this metal binding domain may be used as a potential tool for study bioremediation.

บทนำ (Introduction)

ปัญหามลพิษจากการปนเปื้อนโลหะหนักชนิดต่างๆ เช่น แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ปรอท สารหนูและสังกะสีในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่สำคัญและนับวันจะทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเนื่องจากการมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศทั้งภาคอุตสาหกรรม การคมนาคมขนส่ง เกษตรกรรม และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาทางสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ ก่อให้เกิดผลกระทบต่อประชากรที่อาศัยอยู่ในชุมชนเหล่านั้น ในประเทศไทยมีหลายพื้นที่ที่พบมีการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นแหล่งนิคมอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น น้ำเสียที่ปล่อยจากนิคมอุตสาหกรรม จังหวัดระยองและนิคมอุตสาหกรรมจังหวัดปทุมธานีพบมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น นิกเกิลและสังกะสี ในปริมาณสูง มีการปนเปื้อนของแคดเมียมใกล้พื้นที่บริเวณ โรงงานอุตสาหกรรมที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (Juwa *et al.*, 2008) มีการปนเปื้อนของสารตะกั่วในลำห้วยคลิตี้ล่าง ที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี (ชวิพรรณ และ ภนิตดา, 2551) ส่งผลทำให้เกิดมีการปนเปื้อนของสารพิษโลหะหนักในตะกอนดิน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติเกินค่ามาตรฐานสิ่งแวดล้อมและค่าที่อนุญาตให้มีการบริโภค มีผลเสียต่อระบบนิเวศวิทยาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น

Bioremediation เป็นการนำวิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะจุลินทรีย์มาใช้ในการบำบัดสารเคมี น้ำมันและโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Bonaventura & Johnson, 1997) ในการกำจัดโลหะหนักมีหลายวิธีที่ใช้ศึกษาและทดลองอยู่ในห้องปฏิบัติการเช่น การศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อโลหะหนักจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนเพื่อนำมาช่วยในการกำจัดโลหะหนัก (Pepi *et al.*, 2007; Haferburg & Kothe 2007; De *et al.*, 2008; Rehman, *et al.*, 2008) วิธี Phytoremediation ซึ่งเป็นการทดลองใช้พืชที่ทนต่อโลหะหนักและสามารถสะสมโลหะหนักมา

ช่วยบำบัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม (Gleba *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2007; Arshad *et al.*, 2008; Lone *et al.*, 2008) การใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียโดยเฉพาะพวก Rhizobacteria มาช่วยในการส่งเสริมการกำจัดโลหะหนัก (Glick, 2005; Khan, 2006; Rani *et al.*, 2008)

ปัจจุบันมีความพยายามในการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) และพันธุวิศวกรรม (DNA engineering) มาพัฒนาเพื่อช่วยลดความเป็นพิษ และช่วยในการกำจัดโลหะหนักชนิดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม เช่น การทดลองใช้แบคทีเรียที่ผ่านขั้นตอนทางพันธุวิศวกรรมมาใช้หรือใช้ร่วมกับพืชในการกำจัดโลหะหนัก หรือการศึกษาให้แบคทีเรียที่มีการ express microbial cell surface ของโปรตีนที่จำเพาะมาใช้ในการดูดซับสารและโลหะหนัก (Wu, *et al.*, 2006; Zhuang, *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2008) Heavy metal binding protein คือโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักชนิดต่างๆ ได้อย่างจำเพาะ เช่น Heavy metal binding domain ที่มี CxxC motif ของโปรตีน CopA และ metallochaperone จาก *S. aureus* สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับคอปเปอร์ โคบอลต์ และแคดเมียม (sitthisak *et al.*, 2007) และ metal binding peptide ที่มี sequence เป็น Gly-His-His-Pro-His-Gly (HP) และ Gly-Cys-Gly-Cys-Pro-Cys-Gly-Cys-Gly (CP) สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโลหะหนักแคดเมียม (Kotrba *et al.*, 1999) โปรตีนที่มี Histidine-rich metal binding domain สามารถจับกับคอปเปอร์ได้อย่างจำเพาะ (Battistoni *et al.*, 2001) การศึกษาจนถึงปัจจุบันนี้พบ Heavy metal binding protein ได้หลายชนิด เช่น cysteine rich-metallothioneins (MTs) (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Gupta *et al.*, 2002) Glutathione (GSH) (Penninckx, 2002) และ GSH-related phytochelatin (PCs) (Cobbett & Goldsbrough, 2002) โดย Metallothioneins เป็นโปรตีนขนาดเล็กจากพืชสัตว์และจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำขนาดประมาณ 6.5 kDa,

61-62 amino acid residues โดยมี amino acid พวก cysteine ประกอบอยู่ (Cobett & Goldsbrough, 2002; Vasak, 2005) ส่วนพวก Glutathione (GSH: L-gamma-glutamyl-L-cysteinylglycine) เป็นเปปไทด์ที่จับกับโลหะหนักได้โดย Reduced glutathione (GSH) สามารถ form stable complexes ได้ทั้งกับ hard และ soft metal ions (Krezel & Bal, 1999) GSH-related phytochelatin (PCs) เป็น enzymatically synthesized peptides ที่โครงสร้างประกอบด้วย Glu-Cys จึงมีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักได้ดีกว่าพวก Metallothioneins (Mehra & Mulchandani, 1995; Cobett & Goldsbrough, 2002) นอกจากนี้ synthetic phytochelatin (Ecn) ยังถูกนำมาศึกษาและพบว่าสามารถช่วยเพิ่มการสะสมของโลหะหนักได้ (Bae *et al.*, 2001)

ปัจจุบันมีความพยายามหลายวิธีเพื่อช่วยกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม เช่นการใช้พืชหรือจุลินทรีย์หรือใช้พืชร่วมกับจุลินทรีย์มาช่วยในการกำจัดโดยให้มีการสะสมโลหะหนัก (Bioaccumulation) ในเซลล์ของพืชหรือจุลินทรีย์เหล่านั้น โดยในธรรมชาติพบพืชและจุลินทรีย์สามารถสร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนัก (Heavy metal binding protein) ได้หลายชนิด เช่น โปรตีนที่มี Histidine-rich metal binding domain, cysteine rich-metallothioneins (MTs), Glutathione (GSH) และ GSH-related phytochelatin (PCs) จากความก้าวหน้าของเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในปัจจุบันจึงมีการพัฒนานำเอาเทคนิคทางเหล่านี้มาศึกษาเพื่อช่วยในการกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม มีการตัดต่อยีนที่จับกับโลหะหนักได้ใส่ในแบคทีเรียหรือพืช และนำในศึกษาการกำจัดโลหะหนักได้ในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในระดับโมเลกุลเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการใช้ purified โปรตีนที่ได้จาก Heavy

metal binding domain มาต่อรวมกันและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนในการจับกับโลหะหนัก รวมทั้งปัจจัยอื่นๆที่อาจมีผลต่อการจับของโลหะหนักชนิดต่างๆ กับโปรตีน

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่มีความทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆรวมทั้งโลหะหนักได้ดีโดย ในแบคทีเรีย *S. aureus* จะพบ Heavy metal binding domain ที่ N-terminal ของโปรตีน copper-transporting ATPase ซึ่งมีทั้งที่เป็นแบบ Histidine-rich metal binding domain และ cysteine rich- metal binding domain ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่ต้องการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ Heavy metal binding domain และศึกษาคุณสมบัติและปัจจัยในการจับกับโลหะหนักของโปรตีนนี้และความรู้จากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำ heavy metal binding fusion protein มาใช้เป็นประโยชน์ในการผลิตสารดูดซับโลหะหนักหรือสารกรองโลหะหนักที่ปนเปื้อนในธรรมชาติในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย (Material and Method)

1) สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ครั้งนี้คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109, DH5 α และ BL21 (DE3)

PLysS และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC12600 และ SH1000 (ตารางที่ 1)

โดย *E. coli* จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria- Bertani broth (LB) และ *S. aureus* ถูกเลี้ยง

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 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 สายพันธุ์ ATCC 12600 และ cysteine rich- metal binding domain (amino acid 1-

86) ของยีน copper-transporting ATPase จากแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ SH1000

(ตารางที่ 1) จากนั้นชิ้นส่วนของยีนทั้งสองส่วนจะถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่

จำเพาะกับส่วน heavy metal binding domain และชิ้นส่วนของยีนทั้งสองจะถูกนำมาต่อกันโดยใช้

เอ็นไซม์ ligase จากนั้นทำการ clone ชิ้นส่วนของยีน heavy metal binding domain ที่ต่อกัน

ใน 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 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะ	แหล่งที่มา
<i>S. aureus</i> strains		
SH1000	NCTC 8325-4 with <i>rsbU</i> mutation repair	Horsburgh <i>et al.</i> , 2002
ATCC 12600	a laboratory strain of <i>S. aureus</i>	Kakudo <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> strains		
JM109	<i>rec A1 supE44endA1 hsdR17 gyrA96 relA1</i> <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' (<i>traD36proAB+ lacIQ Z</i> Δ M15)	Promega
BL21(DE3)	(pLyS) F- <i>ompT hsdSB(rB-m-B) gal dcm</i>	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'
<i>mcsa</i>	Mcsa-F (<i>Bam</i> HI)	G <u>CGGATCC</u> GGTGCTTTGTGAAAATTGT CAACTTAA
	Mcsa-B (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTTATGC GTCATCATGTTGCAC
<i>copA</i>	His-F (<i>Hind</i> III)	<u>GAAGCTT</u> ATGGAGCATCATAGTCAT CAAGAAC
	His-B (<i>Eco</i> RI)	GCGAATTCAGCCCCTGATAAAAAATGGCTT

The restriction sites are indicated by underline

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

ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ heavy metal binding domain ใน *E. coli* แบบที่เรียจะถูกลี้งใน LB ที่มี ampicillin และ chloramphenicol ที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่ง OD₆₀₀ ถึง 0.5 จากนั้นเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.0 mM และเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชม. หลังจากนั้นเซลล์จะถูกปั่นเก็บ ล้างด้วย lysis buffer ที่เย็น (20mM Tris, pH 7.4 containing 145 mM NaCl) และ Pellets จะถูกทำให้แตกโดยใช้ 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 การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีน 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 μ l 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 ที่มากเกินไป จากนั้น purified heavy metal binding protein ปริมาณ 100 μ g หรือ 1 mg ของ *E.coli* crude extract จะถูกนำมาใส่ในคอลัมน์และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที คอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก จากนั้นคอลัมน์จะถูกล้างด้วย 500 μ l sodium phosphate buffer และ เก็บโปรตีนที่มีการจับกับโลหะหนักโดยการชะล้างโปรตีนออกมาโดยใช้ 50 mM EDTA ใน sodium phosphate buffer ปริมาตร 100 μ l ตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากช่วงการล้างด้วย EDTA และช่วงที่เก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก (unbound) จะถูกนำไปเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ vacuum centrifuge และนำมาวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE. ปริมาณ total protein ใน crude extract และ โปรตีนที่มีการจับกับโลหะหนักกับปริมาณโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักจะวัดโดยใช้ชุดวัดโปรตีน (Bio-Rad)

4. การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain ของโปรตีน ในสภาวะต่างๆ

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

equilibrated ด้วยสารละลายของโลหะหนักชนิดต่างๆ จากนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน 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 10 นาที

จากนั้นตรวจการจับกับโลหะหนักด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดัง

ข้อ 2.2

5. ความคงทน (stability) ต่ออุณหภูมิของ recombinant metal binding protein

ในการศึกษาความคงทน (stability) ต่ออุณหภูมิที่มีผลต่อการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์

โปรตีน metal binding domain โปรตีนจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนนำไปทดสอบการจับ

กับโลหะหนักชนิด CuSO_4 , CdCl_2 , ZnCl_2 และ CoCl_2 ด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose

chromatography ดังข้อ 2.2

6. การศึกษาผลของโลหะหนักที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการแสดงออกของ

โปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ heavy metal binding domain metal binding domain

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ 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 และโลหะหนักชนิดต่างๆ ได้แก่ CuCl_2 , CdCl_2 ,

ZnCl_2 และ CoCl_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเซลล์ที่ความเร็วรอบ 150

รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้

spectrophotometer

ผลการวิจัย (Result)

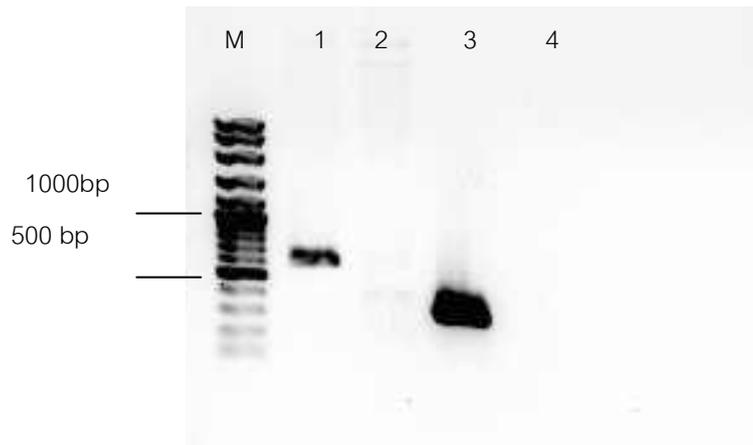
1. การ สร้าง fusion protein ของ *mcsA* จาก *S. aureus* strain SH1000 กับ histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33) จาก *S. aureus* strain ATCC12600 ใน แบคทีเรีย *Escherichia coli*

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-B1* โดยสังเคราะห์ ให้มี 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 ตามที่ต้องการดังแสดง ในรูปที่ 1 เลขที่ 1 จากนั้น PCR product จะถูกตัดด้วย restriction enzyme *Hind*III 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 *Eco*RI 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 เลขที่ 3 จากนั้น PCR product จะถูกตัดด้วย restriction enzyme *Hind*III เก็บไว้ที่ 4 °C

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 โดยการทำให้ 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 โดยการทำให้ colony PCR และ plasmid ที่แยกได้จาก positive clone ของ *E.coli* strain JM109 จะถูก transformed ในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) PLYS (Novagen) พร้อมกับคัดเลือก positive clone โดยการทำให้ colony PCR อีกครั้งและ คัดเลือกหา clone ที่มีการ express protein ออกมาในขนาดที่ต้องการ



รูปที่ 1 PCR product ยีน *mcsA*

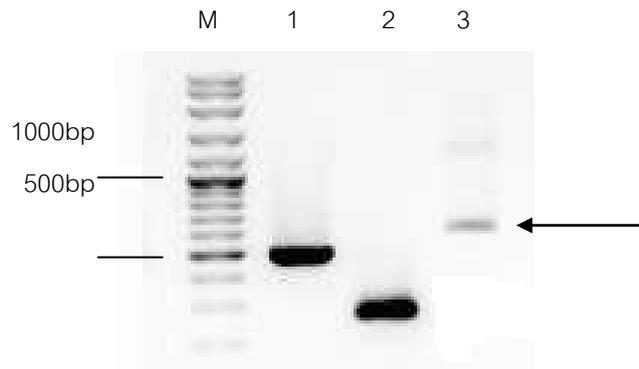
PCR product ของ *mcsA* (527 bp) และ histidine-rich metal binding domain (221 bp)

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

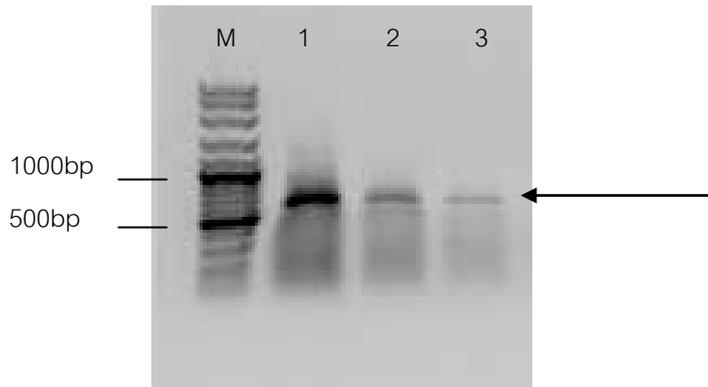
mctsRa gene Lane3 คือ PCR product ของ histidine-rich metal binding domain Lane4

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 ตรวจสอบโดยใช้ 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. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ 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*

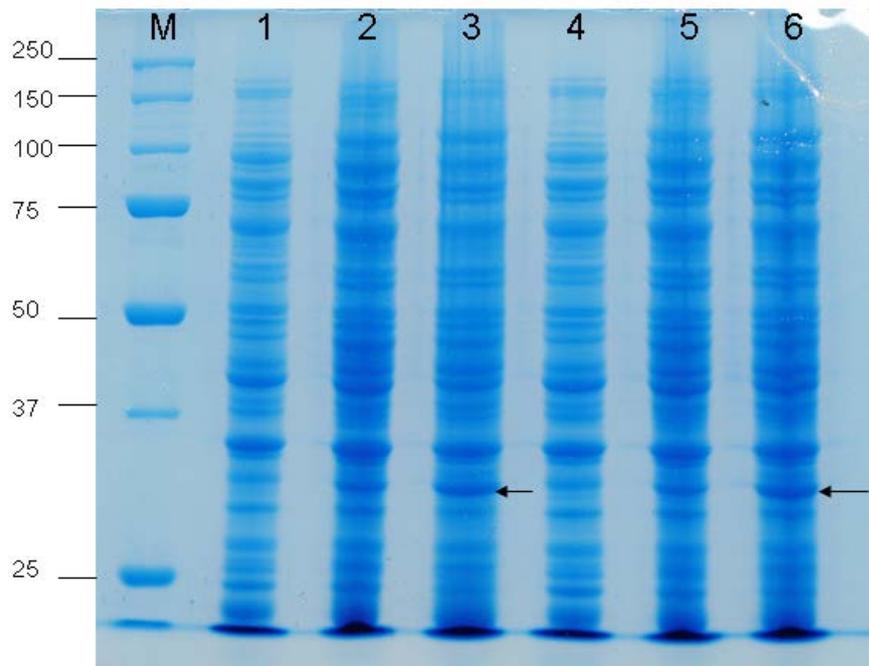
แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 ug/ml และ chloramphenicol 10 ug/ml จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ ชำมคืนที่ 25 °C เก็บ 1 ml ของ culture ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะนำมาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet เติมน้ำ 1X SDS-sample buffer ต้ม 5 นาทีและนำ ตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยพบว่าแบคทีเรีย ทั้ง 2 clone ที่นำมาศึกษา มีการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 30 Kda ตรงตามขนาดของ fusion protein (รูปที่ 4 ลูกศรชี้) โดยโปรตีนที่สร้างขึ้นจะมีการสร้างออกมาหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียชามคืนที่ 25 °C

2.2 ศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน

แบคทีเรีย *Escherichia coli*

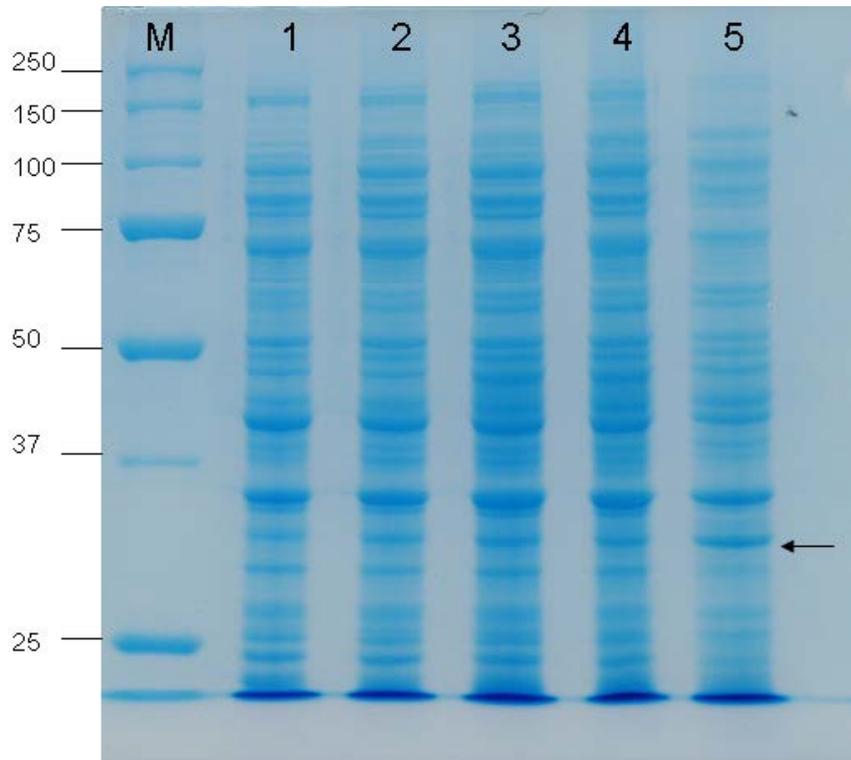
แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 ug/ml และ chloramphenicol 10 ug/ml จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เก็บ 1 ml ของ culture ที่ 1.5, 3, 4.5 ชม. และ ชำมคืน

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 ชม. ชักนำให้มีการสร้างโปรตีนในปริมาณน้อยโดยมีสภาวะที่ดีที่สุดในการชักนำให้มีการสร้างโปรตีนที่การบ่มข้ามคืนที่ 25 °C (รูปที่ 5)



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

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB broth จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีน โดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชม. และ 25 °C ซ้ำมคืน 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 ซ้ำมคืน 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 ซ้ำมคืน ของโคลนที่ 1 ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพ (M) คือ molecular weight masses (kDa).

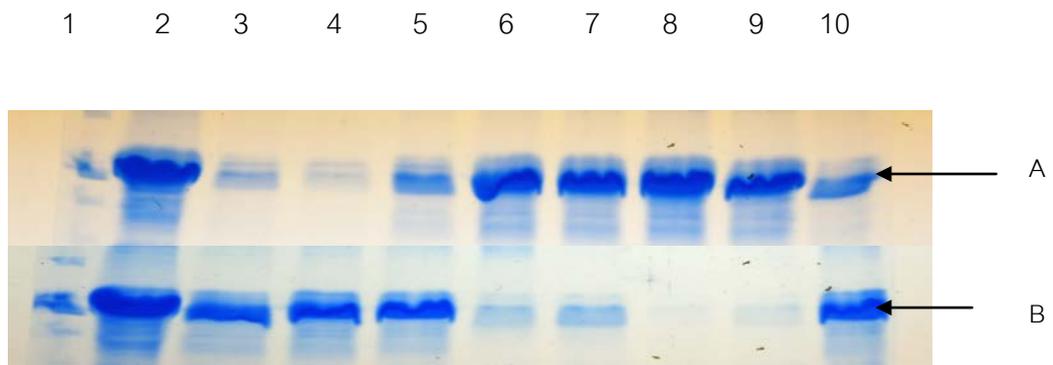


รูปที่ 5 SDS-PAGE analysis ของการสร้างโปรตีน fusion metal binding domain และ His rich domain จาก *S. aureus* ในช่วงเวลาต่างๆ

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB broth จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีน โดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C เก็บ 1 ml ของ culture ที่ 1.5, 3, 4.5 ชม. และ ข้ามคืน จากนั้น ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะ นำมาปั่นเพื่อเก็บ 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 ชม. ; lane 3, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 3 ชม. lane 4. *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 4.5 ชม. lane 5. *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce ข้ามคืน ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพคือ molecular weight masses (kDa).

3. การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain protein มาทดสอบการจับกับโลหะหนัก CuCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 และ $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$ โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography ผลพบว่า protein มีการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} และ Co^{2+} โดยพบโปรตีนหลุดออกมาในขั้นตอนสุดท้ายหลังจาก elute ไล่ออกมาจากคอลัมน์โดยใช้ 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: $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$, 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 จากนั้นเซลล์แบคทีเรียจะถูก induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 3 ชม. แบคทีเรียที่ถูก induced จะถูกเก็บและล้างด้วย 20 mM Tris-HCl ที่มี 145 mM NaCl จากนั้นเซลล์แบคทีเรียจะ resuspended ใน 1 ml 40 mM imidazole, 0.4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mg/ml lysozyme และ 200 μ M PMSF. Cell suspensions จะถูกนำไป Cell suspensions จะถูกนำไป เติม DNaseI (1 μ g/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

รีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain ปริมาณ 25, 50, 100 และ 150 μg จะถูก

นำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก CuCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , CoCl_2 , โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography พบว่าปริมาณโปรตีนในช่วง 25-150 μg สามารถจับกับ

โลหะได้หมด

5.2 อุณหภูมิ

รีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก CuCl_2 , 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

จากนั้นคอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักและไม่

จับกับโลหะหนักต่อไปผลพบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C และ 45 °C ไม่มีผลต่อการจับของโปรตีนกับ

โลหะหนักแต่ที่อุณหภูมิ 65°C ประสิทธิภาพในการจับของโปรตีนกับโลหะ ZnCl_2 , CdCl_2 ,

CoCl_2 ลดลง (ดังแสดงในตารางที่ 4)

5.3 pH

รีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก CuCl_2 ,

ZnCl_2 , CdCl_2 , CoCl_2 , โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography โดย

ขณะที่ทดสอบการจับของโปรตีนกับโลหะหนักจะทำการบ่มโปรตีนและโลหะไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 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

ในการศึกษาครั้งนี้รีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain ที่ได้จะถูกนำไปทดสอบในสภาวะต่างๆ ได้แก่

4.1) ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 °C , 37 °C , 45 °C , 65 °C และ 85 °C เป็นเวลา 10 นาที (thermal stability testing) จากนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain จากนั้นจึงนำไปใช้ในการศึกษาการจับกับโลหะหนักด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2 ผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน metal binding domain ที่อุณหภูมิ 25 °C และ 37 °C โปรตีนสามารถจับกับโลหะหนักได้ทั้ง 4 ชนิด ส่วนที่ 45 °C พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่สามารถจับได้กับ cobalt แต่สามารถจับได้กับ copper , cadmium และ zinc ส่วนที่ 65 °C และ 85 °C พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่สามารถจับได้กับ cobalt 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

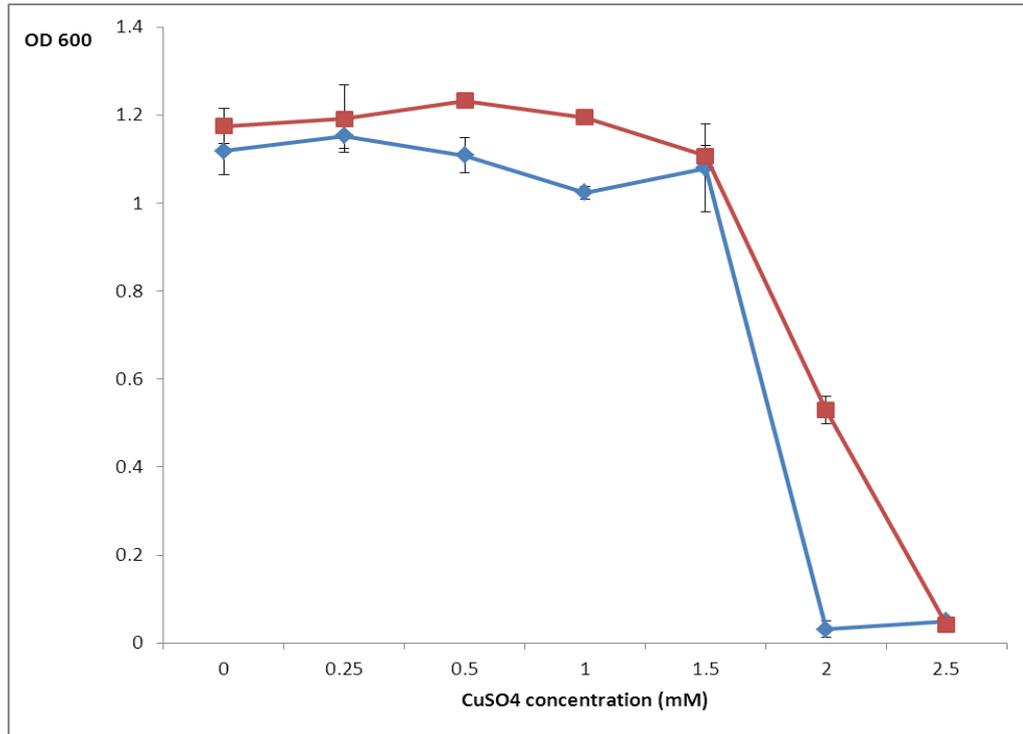
Temp.	CdCl ₂	CoCl ₂	CuCl ₂	ZnCl ₂
25°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+
45°C	+	-	+	+
65°C	-	-	+	+
85°C	-	-	+	+
85°C, 30 min	-	-	+	+

+ = พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

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

เพื่อทดสอบว่าการมีโปรตีน heavy metal binding domain แสดงออกในเซลล์มีผลต่อความทนของเชื้อต่อโลหะหนักทำโดยการศึกษาการเจริญของเชื้อ *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* สายพันธุ์ที่มีการ 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 CuSO₄ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed

heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli*

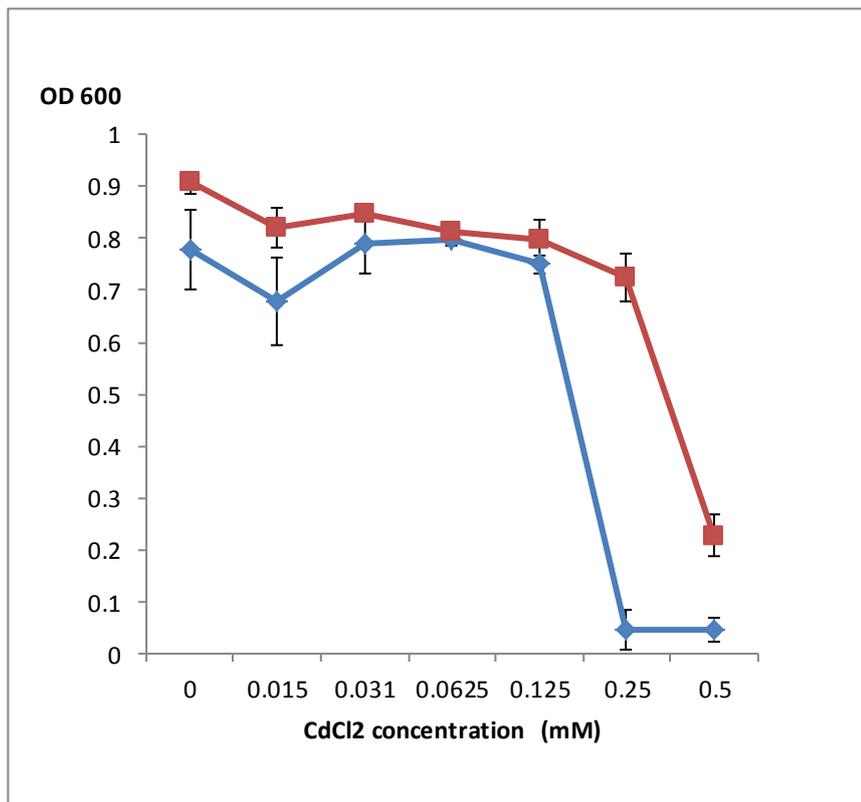
ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM

IPTG และโลหะหนัก CuSO₄ ที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่

ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที่เป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้

spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึง

ค่า ± SD ของสามการทดลอง



รูปที่ 8 ผลของโลหะหนัก CdCl₂ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed

heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli*

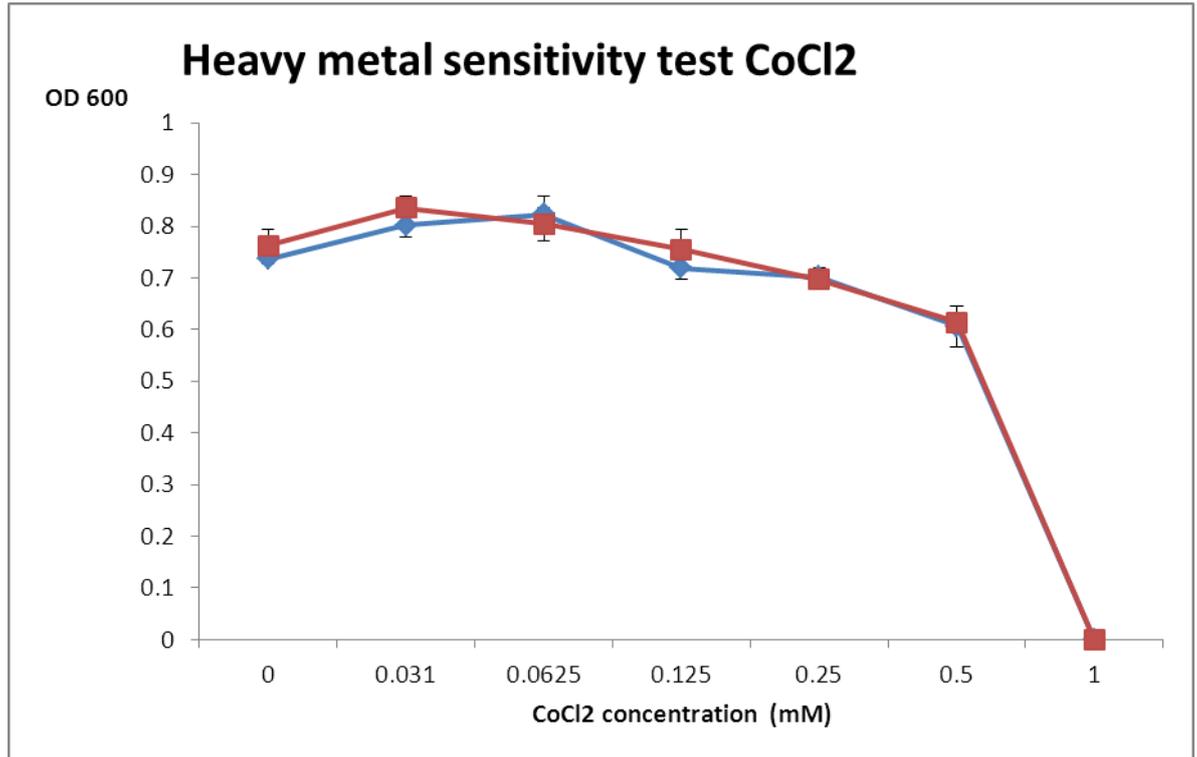
ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM

IPTG และ CdCl₂ ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/

นาที่เป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer

ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า ± SD ของสามการ

ทดลอง



รูปที่ 9 ผลของโลหะหนัก CoCl₂ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli*

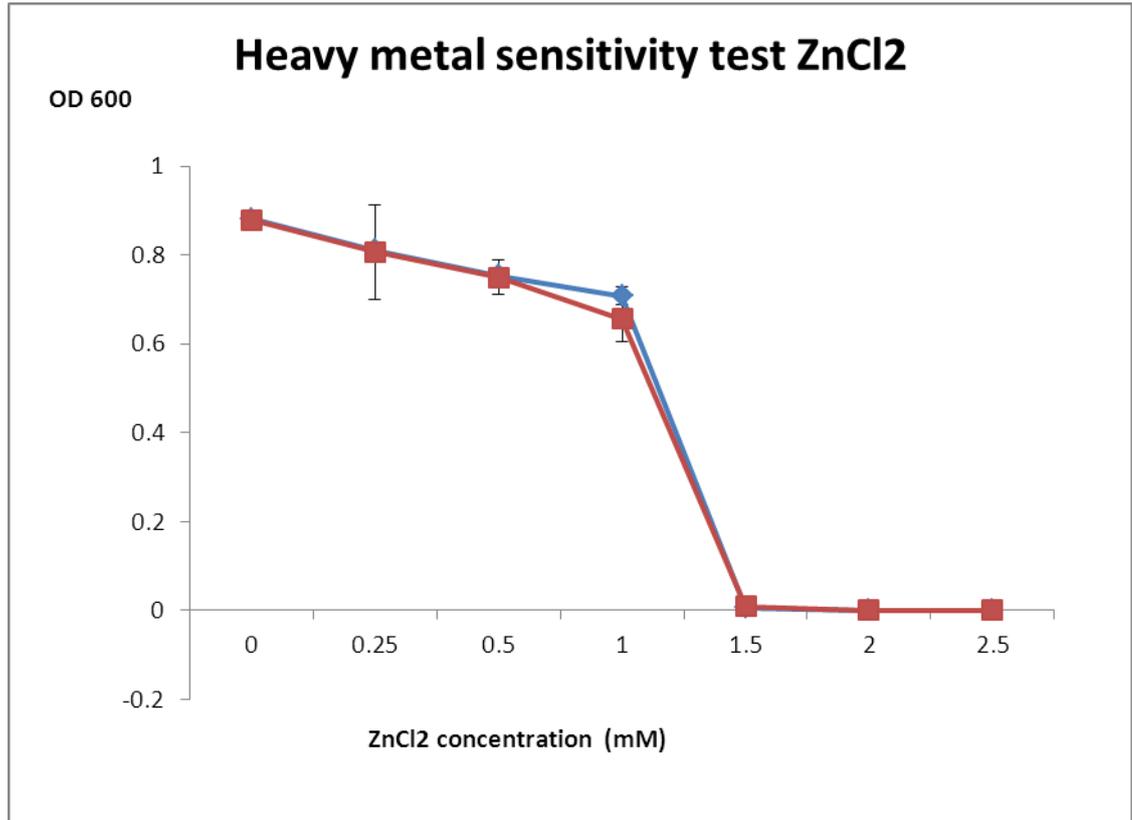
ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM

IPTG และ CoCl₂ ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150

รอบ/นาที่เป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้

spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึง

ค่า ± SD ของสามการทดลอง



รูปที่ 10 ผลของโลหะหนัก ZnCl₂ 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 ZnCl₂ ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150

รอบ/นาที่เป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้

spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึง

ค่า ± SD ของสามการทดลอง

อภิปรายผลการวิจัย

1. การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการวิเคราะห์คุณสมบัติในการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและ crude extract ของ *E. coli*

โปรตีนแต่ละชนิดมีความสามารถในการจับกับโลหะหนักได้แตกต่างกันการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการจับกับโลหะหนักของ MTs ที่มี cysteine-rich motifs สามารถจับกับโลหะ zinc, copper, cadmium และ mercury (Mejare & Bülow 2001; Das *et al.*, 2006) และ CopA, CopZ และ *mcsA* จาก *S. aureus* และโปรตีน N-WND and N-MNK ในคนที่มี CXXC motif สามารถจับ CuCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 และ CoCl_2 (Lutsenko *et al.*, 1997; Sitthisak *et al.*, 2007; 2011) เช่นเดียวกับโปรตีนรีคอมบิแนนท์จาก heavy metal binding domain CXXC motif (McsA) ที่สามารถจับได้กับ CuCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 และ CoCl_2 ปริมาณโปรตีน recombinant ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะ CuCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , CoCl_2 เทียบกับ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ของ *E. coli* BLR(DE3) เท่ากับ 3.53 %, 4.63 %, 3.86 % และ 3.33 % ตามลำดับ

2. ความคงทนของโปรตีนต่อความร้อน, อุณหภูมิ และ pH ที่มีผลต่อการจับโลหะหนัก

การศึกษาคงทนของโปรตีนต่อความร้อน ที่มีผลต่อการจับโลหะหนักพบว่าโปรตีนยังมีความสามารถในการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} หลังจากบ่มโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยที่อุณหภูมิ 55 °C จะเป็นอุณหภูมิที่การทำงานของโปรตีนเอ็นไซม์จะเสียไปส่วนที่อุณหภูมิ 85 °C จะเป็นอุณหภูมิที่โครงสร้างสามมิติของโปรตีนถูกทำลายและโปรตีน

เสถียรภาพ (Huang, 2010) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นแม้โปรตีน heavy metal binding domain CXXC motif (McsA) จะเสถียรภาพก็ไม่มีผลต่อการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} ของ heavy metal binding domain CXXC motif (McsA)

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการจับของโปรตีนพบว่าที่อุณหภูมิ 65 °C โปรตีนสามารถจับกับโลหะ Cu^{2+} แต่ไม่สามารถจับกับโลหะ Cd^{2+} , Co^{2+} , และ Zn^{2+} ได้ขณะที่ pH 3-7 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการจับกับโลหะหนักของโปรตีน ผลจากการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Hinc และคณะ (2010) ที่ได้ expressed CotB ที่มี metal binding domain เป็น poly-his ใน *Bacillus subtilis* spores พบว่าอุณหภูมิ 25-45 °C และ pH 5-9 ไม่มีผลต่อการจับของโลหะหนักกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน

แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif recombinant protein มีการเพิ่มขึ้นของความทนต่อโลหะหนัก

โปรตีนที่จับกับโลหะหนักทำหน้าที่เป็น heavy metal chaperone ในการจับและลดพิษของโลหะหนักเมื่อตอบสนองต่อ stress response จากโลหะหนัก (Jordan et al., 2001; Ettema et al., 2003) ในการศึกษาความทนต่อโลหะหนักพบว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif จะมีความทนต่อโลหะคอปเปอร์ และ แคดเมียม เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ *E. coli* ที่ไม่มีการ expressed โปรตีน ผลเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้เมื่อมีการสร้าง *E. coli* ที่มียีน *cus* system ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Cu^{2+} ให้มีการแสดงออกที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* พบว่า *E. coli* ที่มีการแสดงออกที่ผนังเซลล์ของยีนจาก *cus* system ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Cu^{2+} มีความทนต่อโลหะหนักคอปเปอร์เพิ่มขึ้น (Ravikumar S et al., 2011)

สรุปผลการวิจัยและการนำผลงานวิจัยไปใช้ในอนาคต

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่มี metal binding domain (CxxC motif) มี

ความสามารถกับการจับโลหะหนักได้หลายชนิด ได้แก่ CuCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 และ CoCl_2 โดย

สภาวะการจับโลหะหนักของโปรตีนรีคอมบิแนนท์พบว่าสามารถจับกับโลหะหนักที่ช่วง pH

กว้าง(3-9) และจับกับโลหะหนักที่อุณหภูมิที่สูง $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ได้ การจับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} ของ

โปรตีนรีคอมบิแนนท์ยังทนต่ออุณหภูมิที่สูงถึง $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ได้ 30 นาที แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ

expressed heavy metal binding domain CXXC motif recombinant protein มีการเพิ่มขึ้น

ของความทนต่อโลหะหนัก CuSO_4 และ CdCl_2 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนไป

ใช้ในการศึกษาเพื่อกำจัดโลหะหนักโดยเฉพาะ Cu^{2+} ต่อไปในอนาคต โดยการศึกษาในอนาคต

จะมีการศึกษาเปรียบเทียบการนำ whole cell หรือรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปใช้ในการกำจัดโลหะ

หนัก นอกจากนี้อาจทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติในการจับโลหะหนัก กับ metal binding

domain ชนิดอื่น นอกจากนี้อาจมีการสร้างให้มีโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

เพื่อช่วยการดูดซับโลหะหนักให้เข้ามาสะสมในเซลล์ (bioadsorption) และทำการศึกษา

เปรียบเทียบคุณสมบัติของโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะหนักชนิดต่างๆแล้วสะสมไว้ในเซลล์

(bioaccumulation)

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Arshad M, Silvestre J, Pinelli E, Kallerhoff J, Kaemmerer M, Tarigo A, Shahid M, Guiresse M, Pradere P, Dumat C. (2008). A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium cultivars*. *Chemosphere*. 71(11), 2187-92.
2. Bae W, Mehra RK, Mulchandani A, Chen W. (2001). Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. *Appl Environ Microbiol*. 67(11), 5335-38.
3. Battistoni A, Pacello F, Mazzetti AP, Capo C, Kroll JS, Langford PR, Sansone A, Donnarumma G, Valenti P, Rotilio G. (2001). A histidine-rich metal binding domain at the N terminus of Cu,Zn-superoxide dismutases from pathogenic bacteria: a novel strategy for metal chaperoning. *J Biol Chem*. 276(32), 30315-25.
4. Bonaventura C, Johnson FM. (1997). Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. *Environ Health Perspect*. 105 Suppl 1, 5-20.
5. Cobbett C, Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*. 53, 159-82.

6. Das K, De Groof A, Jauniaux T, Bouquegneau JM. (2006). Zn, Cu, Cd and Hg binding to metallothioneins in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the southern North Sea. BMC Ecol. 6(1), 2.
7. De J, Ramaiah N, Vardanyan L. (2008). Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. Mar Biotechnol. 10(4), 471-7.
8. Ettema TJ, Huynen MA, de Vos WM, van der Oost J. (2003). TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. Trends Biochem Sci.28(4),170-3.
9. Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I. (1999). Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(11), 5973-77.
10. Glick, BR (2001). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnol Adv. 21(5), 383-93
11. Gupta RK, Dobritsa SV, Stiles CA, Essington ME, Liu Z, Chen CH, Serpersu EH, Mullin BC. (2002). Metallothioneins: a new class of plant metal-binding proteins. J Protein Chem. 21(8), 529-36.
12. Haferburg G, Kothe E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. J Basic Microbiol. 47(6), 453-467.

13. Jordan IK, Natale DA, Koonin EV, Galperin MY. (2001). Independent evolution of heavy metal-associated domains in copper chaperones and copper-transporting atpases. *J Mol Evol.* 53(6), 622-33.
14. Juwa S, Supunpaiboon, W, Sarin C, Krissanakriangkrai O. (2008). Health risk assement from foods consumption in cadmium contaminated area, Mae Sot District, Tak province. The 3th International conference on forensic science and medical science, 2008.
15. Khan ,AG. (2006). Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ Sci B.* 7(7), 503-14.
16. Dolecková P, de Lorenzo LV, Ruml, T. (1999). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl Environ Microbiol.* 65(3), 1092-8.
17. Hinc K, Ghandili S, Karbalaee G, Shali A, Noghabi KA, Ricca E, Ahmadian G. (2010). Efficient binding of nickel ions to recombinant *Bacillus subtilis* spores. *Research in Microbiology,*161(9), 757-64.
18. Huang CC, Su CC, Hsieh J, Tseng C, Lin P, Chang J. (2003). Polypeptides for heavy-metal biosorption: capacity and specificity of two heterogeneous MerP proteins. 3(4), 379-85.
19. Kakudo S, Yoshikawa K, Tamaki M, Nakamura E, Teraoka H. (1992). Secretary expression of a glutamic-acid-specific endopeptidase (SPase)

- from *Staphylococcus aureus* ATCC12600 in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 38(2), 226-233.
20. Krezel A, Bal W. (1999). Coordination chemistry of glutathione. *Acta Biochim Pol*. 46(3). 567-80.
21. Lone MI, He ZL, Stoffella PJ, Yang XE. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B*. 9(3), 210-20.
22. Lutsenko S, Petrukhin K, Cooper MJ, Gilliam CT, Kaplan JH. (1997). N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively *in vivo* and *in vitro* with stoichiometry of one copper per metal binding repeat. *Journal of Biological Chemistry* 272(30), 18939-44.
23. Mejáre M, Bülow L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol*. 19(2), 67-73.
24. Mehra RK, Mulchandani P. (1995). Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. *Biochem J*. 307 (Pt 3), 697-05.
25. Pandey S, Gupta K, Mukherjee AK. (2007). Impact of cadmium and lead on *Catharanthus roseus* :a phytoremediation study. *J Environ Biol*. 28(3), 655-62.

26. Penninckx, MJ. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2(3), 295-05.
27. Pepi M, Volterrani M, Renzi M, Marvasi M, Gasperini S, Franchi E, Focardi SE. (2007). Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *J Appl Microbiol.* 103(6), 2299-08.
28. Rani A, Shouche YS, Goel R. (2008). Declination of copper toxicity in pigeon pea and soil system by growth-promoting *Proteus vulgaris* KNP3 strain. *Curr Microbiol.* 57(1), 78-82.
29. Ravikumar S, Yoo IK, Lee SY, Hong SH. (2011). Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. *Appl Biochem Biotechnol.* 165, 1674-81
30. Rehman A, Farooq H, Hasnain S. (2008). Biosorption of copper by yeast, *Loddermyces elongisporus*, isolated from industrial effluents: its potential use in wastewater treatment. *J Basic Microbiol.* 48(3),195-201.
31. Saleem M, Brim H, Hussain S, Arshad M, Leigh MB, Zia-ul-Hassan. (2008). Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. *Biotechnol Adv.* 26(2),151-161.
32. Sambrook J, Russell D (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

33. Sitthisak S, Knutsson L, Webb JW, Jayaswal RK. (2007). Molecular characterization of the copper transport system in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 153(12), 4274-4283.
34. Sitthisak S, Kittit T, Boonyonying K, Wozniak D, Devreese B, Mongkolsuk S, Jayaswal RK. (2011). McsA and the roles of metal binding motif in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Nov 29. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02468.x. [Epub ahead of print]
35. Vasák M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*. 19(1),13-17.
36. Wu CH, Wood TK, Mulchandani A, Chen W. (2006). Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol*. 72(2), 1129-1134.
37. Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int*. 33(3), 406-413.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553

ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส. กมลลา บุญยศียง

นายรัชชัช กิตติ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์

การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร นายธนากร วัชรระสุภัทร นายวรานันท์ ยศปัญญา นางสาว

วรรณภา กะหวัง นิสิตปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ร่วม

ดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor R.K. Jayaswal (Illinois State University) ที่ให้

ความเชื่อเพื่อ ผลิตไมดในการศึกษา และสุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์

การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและภาควิชา จุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์

การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เข้าร่วมนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract ในงาน
นเรศวรวิจัยวันที่ 29-30 ก.ค. 2554 ในหัวข้อเรื่อง “Factor affecting the metal
binding affinity of heavy metal binding domain (CxxC motif) recombinant
protein : a potential for bioremediation”
2. เตรียมบทความตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ไม่มี impact factor) ในหัวข้อ
เรื่อง “Factor affecting the binding of recombinant heavy metal binding domain
(CXXC motifs) protein to heavy metals”
3. ทำการวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับ การศึกษาการจับและสะสมของโลหะหนักของโปรตีนรีคอม
บิแนนท์จากโปรตีนที่จับโลหะหนัก และโปรตีนที่จับโลหะหนักที่มีการแสดงออกบนผนัง
เซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (ทุน window II)

ภาคผนวก (Appendix I)

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานนเรศวรวิจัยวันที่ 29-30 ก.ค. 2554

Abstract

Factor affecting the metal binding affinity of heavy metal binding domain

(CxxC motif) recombinant protein : a potential for bioremediation

Kamala Boonyodying¹, Thanakorn Watcharasupat¹, Waranan Yotpanya¹,

Duangkamol Kunthalert¹ and Sutthirat Sitthisak¹

¹Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science,

Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; Tel: 0-5596-4712; Fax: 0-5596-4770;

E-mail: Kamala.07@hotmail.com

Bioremediation is a biological method for removing heavy metals from the environment. Heavy metal binding proteins have been identified in various organisms and have been used to study for bioremediation. CxxC motif is a metal binding domain that found in all living organisms. In this study, we determined the factors involving metal binding activity of the metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein in order to analyze the potential of the recombinant protein for bioremediation. The protein contain metal binding domain (CxxC motif) from *mcsa* gene of *S. aureus* was cloned, expressed and purified. Recombinant protein was tested for metal binding using IAA resin chromatography. The

recombinant protein can bound to CdCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 and ZnCl_2 . The expression of metal binding proteins that can bind to CdCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 and ZnCl_2 from the total proteins of *E. coli* (BLR(DE3)) are 3.86, 3.3, 3.53 and 4.63%, respectively.

Thermal stability of the recombinant protein was tested at 37 °C, 45 °C, 65 °C for 10 minutes and the results shown that the metal binding activity still present after 65 °C treatment. Temperature that affects the metal binding activity was tested and the results showed that recombinant protein were still bound to CuCl_2 at 65 °C. In conclusion, the results from our study shown that metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein can bind effectively to various types of heavy metals and may be used as a potential tool for bioremediation.

