

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของ intein ของยีน *dnaX* ของ *Spirulina platensis* C1 เพื่อใช้
ในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์โปรตีน

Characterization of DnaX Intein of *Spirulina platensis* C1: Implication for
protein engineering

คณะผู้วิจัย
นางวัฒนา เจียมตน
นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์
นางกอบกุล เหล่าเที่ยง
นางสาวสุตารัตน์ ดุลสวัสดิ์

รายงานการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณ ประจำปี 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ประจำปีงบประมาณ 2550

ชื่อโครงการวิจัย (Research Project)

ภาษาไทย การศึกษาคูณสมบัติของ intein ของยีน *dnaX* ของ *Spirulina platensis* C1 เพื่อใช้ในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์โปรตีน

ภาษาอังกฤษ Characterization of DnaX Intein of *Spirulina platensis* C1: Implication for protein engineering

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วิทยาเขตบางขุนเทียน
49 ซอยเทียนทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน
กรุงเทพฯ 10150

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

นางวัฒนา เจียมตน
(Ms Wattana Jeamton)

ตำแหน่ง

นักวิจัย

สถานที่ทำงาน

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน
49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม
เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

โทรศัพท์

0-2470-7513 โทรสาร 0-2452-3455

Email:

wattana@pdti.kmutt.ac.th
w_chetkul@yahoo.com

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 55 % ของงานวิจัยที่เสนอ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์ (Ms Supapon Cheevadhanarak)
ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์ ระดับ 6
สถานที่ทำงาน	สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0-2470-7469 โทรสาร 0-2452-3455
E-mail:	supapon.che@kmutt.ac.th supaponche@yahoo.com
ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 15% ของงานวิจัยที่เสนอ	
ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางกอบกุล เหล่าเที่ยง (Ms Kobkul Laoteng)
ตำแหน่ง	นักวิจัย 17
สถานที่ทำงาน	หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0-2470-7512 โทรสาร 0-2452-3455
E-mail:	kobkul@biotec.or.th
ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 15 % ของงานวิจัยที่เสนอ	
ผู้ร่วมโครงการ	นางสาวสุดารัตน์ ดุลสวัสดิ์ (Ms Sudarat Dulsawat)
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยนักวิจัย
สถานที่ทำงาน	สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
โทรศัพท์	0-2470-7510 โทรสาร 0-2452-3455

E-mail: sudarat@pdti.kmutt.ac.th

sudarat_d@yahoo.com

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัยที่เสนอ คิดเป็น 15 % ของงานวิจัยที่เสนอ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณโครงการวิจัยหมวดเงินอุดหนุน ประจำปี
งบประมาณ 2550 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2549 ถึงเดือน
กันยายน 2550

บทคัดย่อ

อินทีน หรือ intein คือบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ร่วมกับโปรตีนตั้งต้น หรือ precursor protein ในลักษณะ in frame และจะแยกตัวออกจากโปรตีนตั้งต้นโดยอาศัยกระบวนการ protein splicing ซึ่งเป็น autocatalytic process ได้ผลิตภัณฑ์ของโปรตีนที่สามารถทำงานได้ตามธรรมชาติหรือ native protein ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ DnaX intein ซึ่งเป็น intein ที่พบอยู่ในโปรตีน DNA polymerase III (DnaX) หน่วยย่อย gamma และ tau ของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 พบว่า intein ดังกล่าวมี Hedgehog/Intein domain และ motif sequence ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein splicing ทั้งหมด 6 motif คือ motif A, N2, B, N4, F และ G แต่ไม่พบ endonuclease domain ที่พบได้ใน intein บางชนิด และจากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดกระบวนการ protein splicing ของ DnaX intein โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DnaX intein ไปแทรกอยู่ในยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน GFP เพื่อสร้างยีนลูกผสมที่สามารถถอดรหัสสร้างโปรตีนลูกผสมของ GFP ที่มี DnaX intein แทรกอยู่ และทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิด protein splicing ในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* พบว่า DnaX intein ของ *Spirulina* ที่แทรกอยู่ในโปรตีน GFP สามารถเกิดกระบวนการ protein splicing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ native protein ของ GFP และสามารถจับกับ anti GFP ได้ ผลิตภัณฑ์โปรตีนดังกล่าวยังสามารถเรืองแสงสีเขียวภายในเซลล์แบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่า DnaX intein ของ *Spirulina* มีคุณสมบัติเป็น mini-intein ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ protein splicing ได้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	5
บทคัดย่อ	6
สารบัญเรื่อง	7
สารบัญรูป	8
สารบัญตาราง	9
บทนำ	10
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	10
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	11
ขอบเขตของโครงการวิจัย	11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้	11
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	12
ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	17
วิธีดำเนินการวิจัย	18
เชื้อและพลาสมิดที่ใช้การทดลอง	18
เทคนิคทางด้าน molecular biology	18
การศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ intein ของโปรตีน DnaX (DnaX intein) ของ <i>S. platensis</i> C1	18
การสร้างยีน <i>gfp</i> ที่ถูกดัดแปลงที่มี <i>dnaX</i> intein ของ <i>S. platensis</i> C1 แทรกอยู่ภายในยีนหรือ C(I) <i>gfp</i>	19
การสร้างพลาสมิดที่มียีน <i>gfp</i> ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>dnaX</i> intein แทรกอยู่ภายในยีน	21
การศึกษาหน้าที่และความสามารถของ <i>dnaX</i> intein ต่อกระบวนการ protein splicing ใน <i>E. coli</i> แบบ <i>in vivo</i>	21
ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	23
การศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ intein ของโปรตีน DnaX (DnaX intein) ของ <i>S. platensis</i> C1	23
การสร้างพลาสมิดที่มียีน <i>gfp</i> ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>dnaX</i> intein แทรกอยู่ภายในยีน	26
การศึกษาหน้าที่และความสามารถของ DnaX intein ต่อกระบวนการ protein splicing ใน <i>E. coli</i> แบบ <i>in vivo</i>	27
สรุป	29
เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 Intein regions and conserved motifs	13
รูปที่ 2 Splicing mechanism of inteins	15
รูปที่ 3 Schemes for intein application	16
รูปที่ 4 Tran-splicing mechanism	17
รูปที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน DnaX ของ <i>S. platensis</i> C1 และ ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ	24
รูปที่ 6 โครงสร้างของ mini intein ของ โปรตีน DnaX ของ <i>S. platensis</i> C1	25
รูปที่ 7 ผลิตกัณฑ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างยีน <i>gfp</i> ที่ถูกดัดแปลงให้มี <i>dnaX</i> intein แทรกอยู่ภายในยีน	26
รูปที่ 8 การเรืองแสงของโปรตีน GFP ภายในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i>	27
รูปที่ 9 การตรวจสอบผลิตกัณฑ์โปรตีน GFP ที่แยกจากเซลล์แบคทีเรีย E241/C(I) <i>gfp</i> และแบคทีเรียควบคุม E241 โดยวิธี Western blot analysis	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 primer ที่ใช้ในการสร้างยีน <i>gfp</i> ที่ถูกตัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ <i>dnaX</i> intein แทรกอยู่ในยีน	20

บทนำ

(Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

protein splicing เป็นกระบวนการหลังการสังเคราะห์สายโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์ (post-translation) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการแยกตัวของ protein splicing element หรือที่เรียกว่า intein ออกจาก precursor protein ซึ่งจะเกิดควบคู่กับปฏิกิริยาการเชื่อมต่อของ flanking protein sequence หรือที่เรียกว่า extein ทำให้ได้ native protein หรือ active protein ซึ่งการเกิด protein splicing จัดเป็น autocatalytic process ที่ถูกกระตุ้นโดยอาศัยบริเวณ intein ที่อยู่ใน precursor protein ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก จนแทบจะไม่สามารถตรวจพบ precursor protein ภายในเซลล์ (Perler *et al.*, 1997) จากรายงานการศึกษาของกลุ่มวิจัยต่างๆพบว่าเฉพาะส่วนของ intein และ amino acid ตัวแรกด้าน downstream ของ extein (C-extein) เท่านั้นที่จำเป็นต่อกระบวนการ protein splicing ในขณะที่ส่วนของ extein อาจมีผลต่ออัตราการเกิด protein splicing (Davis *et al.*, 1992; Cooper *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993) จากความสามารถในการทำให้เกิด protein splicing ของ intein ได้ทั้งในเซลล์สิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ทำให้มีความสนใจอย่างมากในการศึกษากลไกการทำงานของ intein สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ทั้งในการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ เช่น protein chemistry, protein engineering, enzymology, microarray production และ target detection ตลอดจนนำมาใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงผลิตภัณฑ์โปรตีนชนิดต่างๆ (Perler and Adam, 2000)

จากการโคลนยีน *dnaX* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* C1 ของกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพด้านสาหร่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน DNA polymerase III (DnaX) หน่วยย่อย gamma และ tau พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีบริเวณที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติเป็น intein ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจทำการศึกษายบริเวณ intein ดังกล่าว โดยการวิเคราะห์หน้าที่และศึกษาคุณสมบัติของบริเวณ intein ของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* ต่อกระบวนการ protein splicing แบบ *in vivo* โดยอาศัยแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็น heterologous host ซึ่งความรู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein splicing ที่เกิดจากการทำงานของ intein ในสิ่งมีชีวิต prokaryote นี้ จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์จาก intein เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการศึกษากระบวนการทำงานต่างๆภายในเซลล์ เช่น protein nuclear transport (Kim *et al.*, 2004) และ protein-protein interaction (Ozawa *et al.*, 2000; Ozawa *et al.*, 2001) ร่วมกับเทคโนโลยีด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีน ในแง่การประยุกต์ทางด้าน protein technology และ protein engineering เพื่อใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงผลิตภัณฑ์โปรตีนต่างๆต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาหน้าที่และคุณสมบัติของ intein ของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 ต่อกระบวนการ protein splicing ในเซลล์ *E. coli*

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของบริเวณ intein ของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 โดยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของ intein โดยอาศัยฐานข้อมูลของโปรตีนและอินทีน (protein and intein databases) เพื่อตรวจหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ซึ่งผลที่ได้ถูกนำไปใช้ในการออกแบบในการศึกษาหน้าที่ของ intein ต่อกระบวนการ protein splicing ใน *E. coli* แบบ *in vivo* โดยทำการสร้าง expression plasmid ที่ออกแบบให้มี intein แทรกอยู่ในยีน *gfp* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้เป็นโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein; GFP) ในที่ตำแหน่งที่คาดว่าจะทำให้ intein สามารถทำงานได้ และนำพลาสมิดลูกผสม หรือ expression plasmid ที่สร้างได้นี้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยวิธี chemical transformation จากนั้นทำการวิเคราะห์กระบวนการ protein splicing ภายในเซลล์ของ *E. coli* โดยทางอ้อม (indirect measurement) โดยการติดตามการสร้างโปรตีน GFP ภายในเซลล์ *E. coli* ภายใต้กล้อง fluorescent microscope ร่วมกับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่แยกได้จากเซลล์ *E. coli* transformant ด้วยเทคนิค Western blot analysis

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่น่าผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

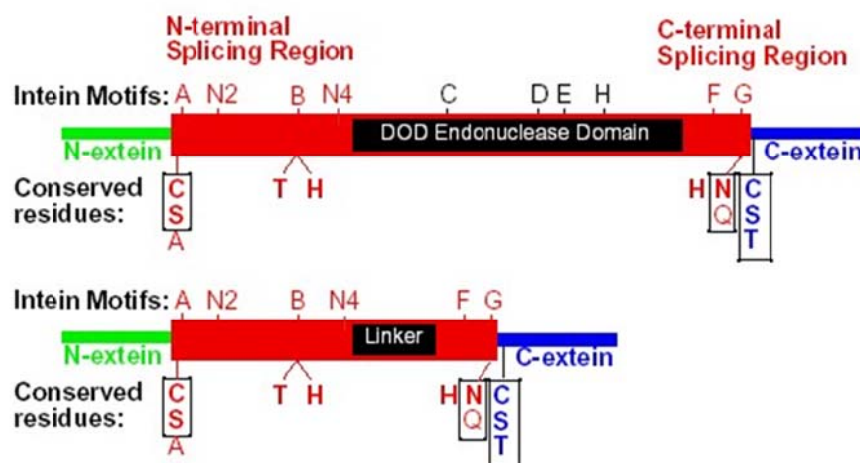
ได้รับความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของบริเวณ intein ของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 ในการทำให้เกิดกระบวนการ protein splicing ซึ่งความรู้ที่ได้จะนำมาซึ่งการใช้ประโยชน์ของการใช้ intein ในการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่เพื่อใช้ในการศึกษาชีววิทยาภายในเซลล์ ตลอดจนนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตภัณฑ์โปรตีนใหม่ๆ หรืออุตสาหกรรมการผลิตเครื่องมือในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยประโยชน์คือ หน่วยงานวิจัยที่ศึกษาทางด้าน protein chemistry, protein engineering, biotechnology รวมทั้งภาคอุตสาหกรรมที่มีความสนใจในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์โปรตีน หรืออุตสาหกรรมที่ผลิตเครื่องมือในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ เช่น การผลิต column ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ หรือการผลิต protein array

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

จากการพบ intein ครั้งแรกในยีนสร้างโปรตีน vacuolar H(+)-adenosine triphosphate (VMA) ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในปี ค.ศ. 1990 (Hirata *et al.*, 1990; Kane *et al.*, 1990) ทำให้มีการแยกและศึกษาโครงสร้างของ intein ตลอดจนกลไกในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ protein splicing ที่เป็นผลสืบเนื่องมาจากการทำงานของ intein และได้มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่องในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา ในปัจจุบันมีการพบและเก็บรวบรวมข้อมูลของ intein ไว้ใน Intein database หรือ InBase (www.neb.com/neb/inteins.html) ซึ่งเป็นข้อมูล intein ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ทั้ง eukaryote, eubacteria และ archaeobacteria

โดยทั่วไป intein ประกอบด้วย 2 ส่วนที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน คือ ส่วนของ protein splicing domain และส่วนของ endonuclease domain ส่วนของ protein splicing domain นั้นยังจะถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนย่อย ซึ่งเป็นผลจากการแทรกของ endonuclease domain หรือ amino acid linker ขนาดสั้นๆ ที่มักพบเฉพาะใน intein บางชนิดที่ไม่มีส่วนของ endonuclease domain หรือที่เรียกว่า mini intein ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยที่การทำงานของ protein splicing domain และ endonuclease domain นี้จะเป็นอิสระต่อกัน (Paulus, 2000) ส่วนของ protein splicing domain มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการแยกตัวของ intein ออกจาก precursor protein และช่วยในการเชื่อมต่อของ flanking extein ในขณะที่ endonuclease domain เป็น mobile genetic element ซึ่งสามารถจำลองตัวเองและแทรกเข้าไปใน homologous allele ที่ไม่มี intein (Liu, 2000) จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ intein ชนิดต่างๆ สามารถจำแนก conserved intein motif ได้ทั้งหมด 10 motifs คือ Block A, N2, B, N4, C, D, E, H, F และ G (รูปที่ 1) และพบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนอยู่ 4 ตำแหน่ง โดยที่กรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเหล่านี้มีบทบาทในการเกิด protein splicing โดยตำแหน่งแรก ได้แก่ กรดอะมิโนตัวแรกของด้าน N-terminus ของ intein ซึ่งมักอนุรักษ์ไว้เป็น Serine (Ser, S), Threonine (Thr, T), หรือ Cysteine (Cys, C) ในบางกรณีอาจเป็น Alanine ส่วนตำแหน่งที่สอง ได้แก่ Asparagine (Asn, N) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวสุดท้ายของด้าน C-terminus ของ intein ตำแหน่งที่สาม คือ กรดอะมิโนตัวแรกของด้าน downstream ของ extein ซึ่งมักอนุรักษ์ไว้เป็น Serine, Threonine หรือ Cysteine ตำแหน่งสุดท้ายที่มีการอนุรักษ์ไว้ได้แก่ Histidine (His, H) ที่อยู่หน้า Asparagine ที่มีการอนุรักษ์ไว้ในบริเวณ C-terminus ของ intein นอกจากทั้ง 4 ตำแหน่งดังกล่าวแล้วยังพบบริเวณ conserved sequence ของกรดอะมิโน T-x-x-H อยู่ในบริเวณ conserved motif B (รูปที่ 1)

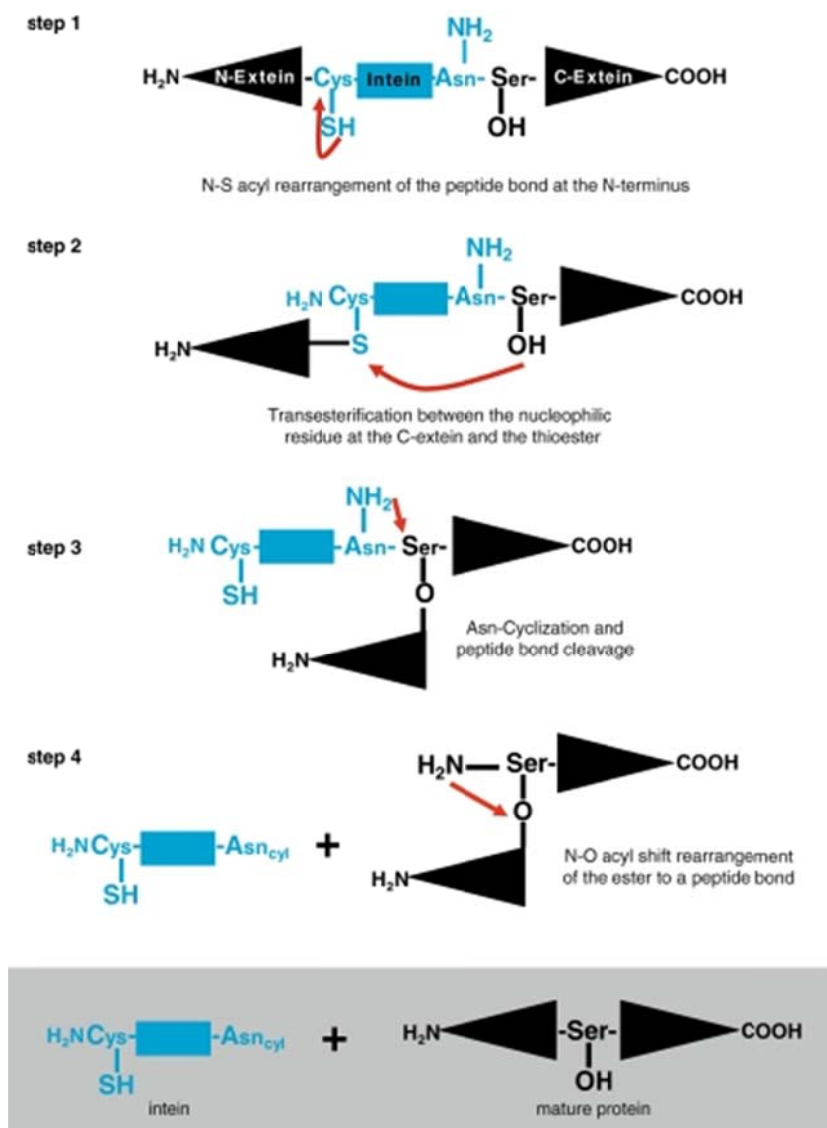


รูปที่ 1 Intein regions and conserved motifs (www.neb.com/neb/inteins.html).

จากการศึกษากลไกการเกิด protein splicing ของกลุ่มวิจัยต่างๆ (Noren, 2000; Paulus, 2000; Perler *et al.*, 1998, Perler *et al.*, 1997) พบว่าประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ 1) N-X acyl rearrangement 2) Transesterification 3) Asparagine Cyclization และ 4) X-N acyl rearrangement ดังแสดงในรูปที่ 2 ในขั้นตอนแรก N-X Acyl Rearrangement นั้นเป็นปฏิกิริยา nucleophilic attack ของกรดอะมิโนตัวแรกที่ถูกอนุรักษ์ไว้ที่ N-terminus ของ intein กับ carbonyl carbon ของ C-terminus ของ N-extein ทำให้เกิด ester หรือ thioester bond จากนั้นในขั้นตอนที่สอง ester หรือ thioester bond ที่ได้จะทำปฏิกิริยา transesterification กับ hydroxyl หรือ thiol group ของกรดอะมิโนตัวแรกของ C-extein ทำให้เกิดการแยก N-extein ออกจาก N-terminus ของ intein และไปเชื่อมต่อกับ C-extein เกิดเป็น branched protein intermediate ซึ่งแขนงของ branched protein intermediate นี้จะถูกแยกออกจากกันโดยปฏิกิริยา Asn cyclization ในขั้นตอนที่สาม ซึ่งเป็นปฏิกิริยา cyclization ของ Asparagine ที่บริเวณ C-terminal intein เกิดเป็น succinimide ring มีผลให้เกิดการแยกของ C-terminal intein ออกจาก extein ในขั้นตอนสุดท้ายจะเกิด spontaneous X-N rearrangement เพื่อสร้าง native peptide bond ระหว่าง N-extein และ C-extein ได้ native protein เป็นผลิตภัณฑ์

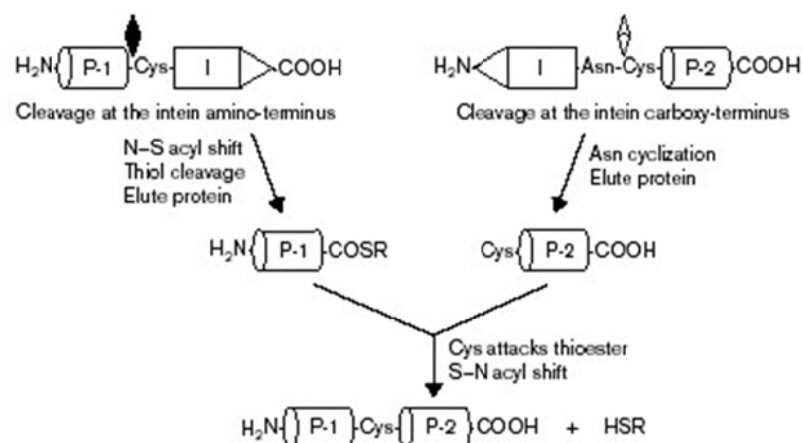
การค้นพบและความเข้าใจในกลไกการแยกตัวเองของ intein ออกจาก precursor protein นำมาสู่การพัฒนาเทคโนโลยีใหม่อย่างต่อเนื่อง เพื่อนำ intein มาใช้ประโยชน์ทั้งในทาง protein chemistry และ protein engineering (Perler and Adam, 2000) เทคโนโลยีแรกที่มีการพัฒนาขึ้นและมีการใช้ประโยชน์ทั่วไปในกระบวนการ protein purification คือเทคนิค Intein-Mediated Protein Purification หรือ Intein-Mediated Affinity Chromatography ซึ่งในเทคนิคนี้ได้ใช้ปลายด้านหนึ่งของ intein เชื่อมต่อกับ affinity tag ในขณะที่ปลายอีกด้านหนึ่งจะถูกเชื่อมต่อกับโปรตีนที่สนใจ ภายหลังการดูดซับสารตัวอย่างลงใน affinity column แล้วโปรตีน ที่สนใจจะถูกแยกออกจาก column โดยการเติม thiol reagent ทำให้เกิดปฏิกิริยา N-S acyl rearrangement ระหว่างโปรตีนที่สนใจ กับ intein ทำให้โปรตีนถูกแยก

ออกมาพร้อมกับ thiol reagent จากนั้นโปรตีนจะถูกทำให้บริสุทธิ์จาก thiol reagent โดยปฏิกิริยา hydrolysis ส่วนเทคโนโลยีที่สอง คือ Intein-Mediated Protein Ligation หรือ Express Protein Ligation (IPL or EPL) ซึ่งในเทคนิคนี้ protein 2 ชิ้น จะถูกเชื่อมต่อกับ intein 2 ชุด ที่ปลาย N-terminus และ C-terminus ของ intein แต่ละชุด ซึ่งภายหลังการเติม thiol reagent จะทำให้ protein ทั้ง 2 ชิ้นหลุดออกจาก intein และมาเชื่อมต่อกันเป็น native protein หรือ recombinant protein (รูปที่ 3) ซึ่งเทคนิค IPL/EPL สามารถใช้ได้ทั้งกับ expressed protein และ chemically synthesized protein หลากๆชนิด เช่น labeled protein, modified protein, fluorescently labeled protein, tagged protein เป็นต้น (Perler and Adam, 2000) เทคนิค IPL/EPL นี้มีการพัฒนาและนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายๆด้าน เช่น การสร้าง cyclized protein โดยอาศัย two intein (TWIN) system (Evans *et al.*, 1999) และการติดฉลากโปรตีนด้วย isotope เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนด้วยเทคนิค NMR (Otomo *et al.*, 1999) เทคโนโลยี Protein *trans*- Splicing เป็นอีกเทคโนโลยีหนึ่งที่น่า intein มาประยุกต์ใช้ ซึ่งเทคนิคนี้ทำได้โดยการแยก intein ออกจากกันเป็น 2 ส่วน (split intein) แต่ละส่วนของ intein จะเชื่อมต่อกับ extein แต่ละชนิดที่สนใจ และนำไปแสดงออกใน host แยกกัน เมื่อนำ intein แต่ละส่วนที่เชื่อมต่อกับ extein มารวมกันมีผลทำให้เกิดการ reassociation ของ intein ได้เป็น active intein ซึ่งจะทำให้เกิด protein splicing ได้โปรตีนที่สนใจ (รูปที่ 4) ซึ่ง split intein นี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น การสร้าง cyclic peptide โดยกระบวนการที่เรียกว่า *in vivo* split intein-mediated circular ligation of peptide and proteins (SICLOPPS) การใช้ split intein ในการติดตาม protein-protein interaction ภายในสิ่งมีชีวิต (Ozawa *et al.*, 2000) เป็นต้น

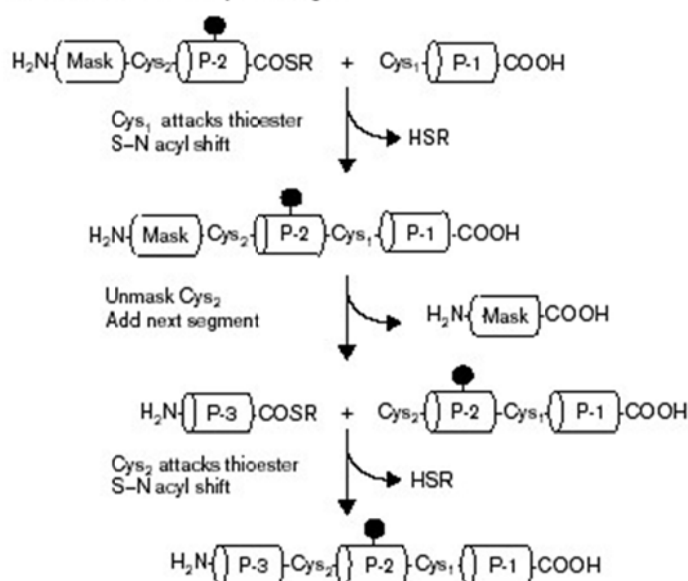


รูปที่ 2 Splicing mechanism of inteins (Elleuche and Pöggeler, 2010)

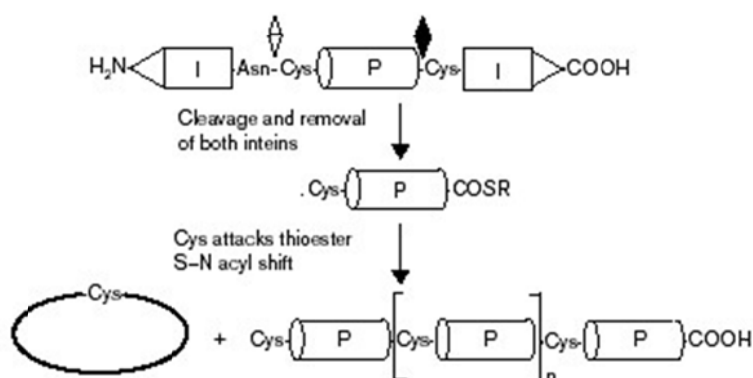
(a) Intein-mediated protein ligation (IPL or EPL)



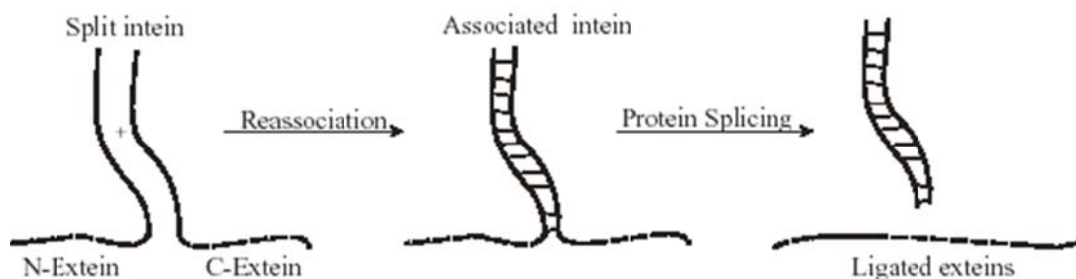
(b) Sequential intein-mediated protein ligation



(c) Twin system for cyclization or polymerization



รูปที่ 3 Schemes for intein application. (a) IPL/EPL (b) sequential IPL/EPL and (c) Twin system for cyclization or polymorphism (Perler and Adam, 2000)



รูปที่ 4 Tran-splicing mechanism (Lew *et al.*, 1999)

ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

intien ที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยทั่วไปพบว่าจะอยู่ใน protein ที่มีความสัมพันธ์กับ DNA เช่น DNA polymerase (Liu and Yang, 2003) การแยกหรือการวิเคราะห์ intein ออกจากลำดับกรดอะมิโนของ precursor protein ทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจาก intein จะอยู่เป็น reading frame เดียวกันกับ extein ดังนั้นการวิเคราะห์ว่ามี intein อยู่ใน protein หรือไม่จะอาศัยจากการสังเกตจากขนาดของ protein sequence ที่กำลังศึกษาว่าซึ่งมีขนาดยาวกว่า protein ชนิดเดียวกันที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น และทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนเพื่อตรวจหาบริเวณที่คาดว่าจะเป็ intein โดยอาศัยคุณสมบัติของ intein ที่มีการอนุรักษ์กรดอะมิโน Ser (หรือ Thr หรือ Cys) ไว้ที่บริเวณ N-terminus ของ intein และการอนุรักษ์ของบริเวณ intein junction ระหว่าง C-terminus ของ intein และ N-terminus ของ extien ซึ่งมักมีการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนดังนี้ คือ His-Asn ของ C-terminus ของ intein ต่อด้วย Ser (หรือ Thr หรือ Cys) ของ N-extein (Perler *et al.*, 1997)

ทางกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีสำหรับ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้โคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *dnaX* ที่สร้างโปรตีน DNA polymerase III (DnaX) หน่วยย่อย *gamma* และ *tau* ของ *S. platensis* C1 พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ DnaX มีขนาดใหญ่กว่าของ *E. coli* และไฮยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ จากการศึกษาเปรียบเทียบ amino acid sequence ในส่วนที่แตกต่างกับ DnaX ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าว พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็ intein โดยพบว่าบริเวณดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโน ในบริเวณที่คาดว่าจะเป็ N-terminal intein คือ Cry และบริเวณ C-terminal intein junction เป็ His-Asn-Cys ซึ่งสอดคล้องกับบริเวณอนุรักษ์ของ intein ที่พบโดยทั่วไป ทำให้สันนิฐานได้ว่า DnaX protein ของ *S. platensis* C1 น่าที่จะมี intein ที่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิด protein splicing ได้ ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีสำหรับจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบัติและความสมารถของ DnaX intein ของ *S. platensis* C1 ในการทำให้เกิดกระบวนการ protein splicing เพื่อที่จะนำ DnaX intein ดังกล่าวไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ใน protein technology ต่างๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

1.1 แบคทีเรียเอสเชอริเชีย คอลิ สายพันธุ์ ดีเอช 5 แอลฟา (*E. coli* DH5 α) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งหรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไลโซจีนีบรอต (Lysogeny broth, LB) ที่ 37 °C เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มปริมาณและเก็บพลาสมิดต่างๆตลอดการทดลอง

1.2 ไชยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* สายพันธุ์ C1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Zarrouk ที่อุณหภูมิ 30 °C ความเข้มแสง 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เพื่อใช้เป็นแหล่งของของดีเอ็นเอในการโคลน *dnaX* intein

1.3 พลาสมิด pMG241 หรือ pAG 69 (Jeamton, 2010) เป็นพลาสมิดที่ยีน *gfp* ภายใต้การควบคุมของ phycocyanin promoter ของ *S. platensis* C1 ใช้เป็นแหล่งในการโคลนยีน *gfp* และใช้เป็นเวกเตอร์ในการแทนที่ยีน *gfp* ด้วย ยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มี *dnaX* intein ของ *S. platensis* C1 ในที่นี้ให้ชื่อว่ายีน chimeric intein-GFP หรือ ยีน C(I) *gfp*

2. เทคนิคทางด้าน molecular biology

เทคนิคทางด้าน molecular biology ส่วนใหญ่ที่ใช้ในงานวิจัยดำเนินการตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989)

3. การศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ intein ของโปรตีน DnaX (DnaX intein) ของ *S. platensis* C1

ทำการศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ DnaX intein ของ *S. platensis* C1 โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน DnaX หรือ เอ็นไซม์ DNA polymerase III หน่วยย่อย gamma และ tau ของ *S. platensis* C1 และของไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ เพื่อวิเคราะห์หาบริเวณที่คาดว่าจะเป็น intein โดยสังเกตจากลำดับกรดอะมิโนที่เพิ่มเติมเข้ามาในกรดอะมิโนของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 ที่ไม่พบในโปรตีน DnaX ของไชยาโนแบคทีเรียอื่นๆ จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่คาดว่าจะจะเป็น DnaX intein ไปวิเคราะห์หา conserved domain ด้วย NCBI conserved domain search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) และนำลำดับกรดอะมิโนของ DnaX intein ไปวิเคราะห์หา motif sequences ที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดกระบวนการ protein splicing โดยการเปรียบเทียบกับ motif sequences ของ intein ที่ได้มีการเสนอไว้โดย Pietrovski (1994; 1998) และ Perler *et al.* (1997)

4. การสร้างยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงที่มี *dnaX* intein ของ *S. platensis* C1 แทรกอยู่ภายในยีนหรือ C(I) *gfp*

4.1 การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการสร้างยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลง (C(I) *gfp*)

การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการสร้างยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงทำได้ดังนี้

4.1.1 ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gfp* เพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมในการแทรก *dnaX* intein เข้าไปเพื่อใช้ในการออกแบบ primer โดยอาศัยคุณสมบัติ extein ต่อกระบวนการ protein splicing ที่พบว่าเฉพาะกรดอะมิโนตัวแรก ของ C-terminus ของ extein เท่านั้นที่มีผลต่อการเกิด protein splicing โดยที่กรดอะมิโนตัวแรกของ C-terminus ของ extein พบว่ามีกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็น cysteine หรือ serine หรือ Threonine จึงเลือกกรดอะมิโน cysteine ในตำแหน่งที่ 70 ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน GFP เป็นกรดอะมิโนตัวแรกที่ใช้ในการแทรก DnaX intein ซึ่งภายหลังการแทรกมีผลทำให้โปรตีน GFP ในบริเวณ N-terminus (กรดอะมิโนที่ 1-69) แยกออกจาก C-terminus ของโปรตีน GFP (กรดอะมิโนที่ 70-238)

4.1.2 ทำการออกแบบ primer 3 คู่ (ตารางที่ 1) เพื่อใช้ในการสร้างยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงดังนี้

primer คู่ที่ 1 ประกอบด้วย sense primer คือ GFP Mu2 with *Xba*I (F) ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ใน บริเวณ upstream และบริเวณ N-terminus ของยีน *gfp* ที่อยู่ในพลาสมิด pMG241 โดยที่ปลายด้าน 5' ของ sense primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Xba*I (บริเวณที่ขีดเส้นใต้) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็น ribosome binding site (บริเวณที่เป็นตัวหนา) และ antisense primer คือ GFP-N-terminal extein (R) ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 3' ของ N-terminus ของ GFP รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DnaX intein. ในบริเวณ N-terminus (บริเวณตัวอักษร lowercase)

primer คู่ที่ 2 ประกอบด้วย sense primer คือ GFP-N-terminal intein (F) ที่ออกแบบมาจากบริเวณปลาย 3' ของ N-terminus ของ GFP รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DnaX intein. ในบริเวณ N-terminus (บริเวณตัวอักษร lowercase) และ antisense primer คือ GFP-C-terminal intein (R) ที่ออกแบบมาจากบริเวณปลาย 5' ของ C-terminus ของ GFP รวมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DnaX intein. ในบริเวณ C-terminus (บริเวณตัวอักษร lowercase)

primer คู่ที่ 3 ประกอบด้วย sense primer คือ GFP-C terminal extein (F) ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DnaX intein. ในบริเวณ C-terminus (บริเวณตัวอักษร lowercase) รวมกับบริเวณปลาย 5' ของ C-terminus ของ GFP และ antisense primer คือ GFP Mu2 with *Pst*I (R) ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ C-terminus และ บริเวณ downstream ของยีน *gfp* ที่อยู่ใน plasmid pMG241 โดยที่ปลายด้าน 5' ของ antisense primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Pst*I (บริเวณที่ขีดเส้นใต้)

ตารางที่ 1 primer ที่ใช้ใน การสร้างยีน *gfp* ที่ถูกตัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *dnaX* intein แทรกอยู่ในยีน

คู่ primer	Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
1	GFP Mu2 with XbaI (F)	GCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTAAAGG
	GFP N-terminal extein (R)	catcacccgtcagacaTTGAAGACCATACGCGAA
2	GFP-N-terminal intein (F)	CGCGTATGGTCTTCAAtgtctgacgggtgatgct
	GFP-C-terminal intein (R)	GGTATCTCGCAAAGCAattgtgaactagcagacc
3	GFP- C terminal extein (F)	tctgctagtgcacaatTGCTTTGCGAGATACCCA
	GFP Mu2 with PstI (R)	AACTGCAGGTCTGGACATTTATTTGTATAGTTC

4.2 การสร้างยีน *gfp* ที่ถูกตัดแปลงให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ในยีน หรือ C(I)*gfp* โดยอาศัยเทคนิค fusion PCR

4.2.1 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน *gfp* N-terminus และ *gfp* C-terminus โดยใช้ พลาสมิดดีเอ็นเอ pMG241 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) โดยใช้ primer คู่ที่ 1 และ คู่ที่ 3 ตามลำดับ และเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ *dnaX* intein โดยใช้ดีเอ็นเอจากจีโนม ของ *S. platensis* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) โดยใช้ primer คู่ที่ 2 ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่ 50 µl ประกอบด้วย คีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 mM พิซีอาร์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า (PCR buffer 1x) เอ็นไซม์แท็กดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Platinum *Taq* polymerase High Fidelity; Invitrogen) 1.0 ยูนิต แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) 2 mM ดีเอ็นเอแม่แบบ 100 ng และใช้ sense และ antisense primer อย่างละ 40 pmol โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ดังนี้

95°C 4 นาที	1 รอบ
95°C 30 วินาที, 52°C 40 วินาที, 68°C 1 นาที	35 รอบ
68°C 10 นาที	1 รอบ

4.2.2 การสร้างยีน *gfp* ที่ถูกตัดแปลงให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ในยีน

สร้างดีเอ็นเอลูกผสม F1 ของ *gfp* N-terminus และ *dnaX* intein โดยใช้ดีเอ็นเอของ N-terminus ของ *gfp* และ *dnaX* intein ที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนข้อ 4.2.1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเชื่อมต่อและเพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิค fusion PCR โดยใช้ primer ชนิด GFP Mu2 with XbaI (F) และ GFP-C-terminal intein (R) จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสม F1 ที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบร่วมกับ *gfp* C-terminus ที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนข้อ 4.2.1 เพื่อสร้างดีเอ็นเอลูกผสม F2 หรือยีน *gfp* ที่ถูกตัดแปลงให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ในยีน (C(I)*gfp*) โดยใช้ primer ชนิด GFP Mu2 with XbaI (F) และ ชนิด GFP Mu2 with PstI (R)

ในปฏิกิริยาการสร้างและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมแต่ละชนิดที่ 50 μ l ประกอบด้วย คีออกซิโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 mM พืชีอาร์บัพเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า (PCR buffer 1x) เอนไซม์แท็กดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Platinum *Taq* polymerase High Fidelity; Invitrogen) 1.0 ยูนิต แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 2 mM ดีเอ็นเอแม่แบบชนิดละ 1 μ l และใช้ sense และ antisense primer อย่างละ 40 pmol โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) ดังนี้

95°C 4 นาที	1 รอบ
95°C 30 วินาที, 52°C 40 วินาที, 68°C 1 นาที 30 วินาที	35 รอบ
68°C 10 นาที	1 รอบ

5. การสร้างพลาสมิดที่มียีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *dnaX* intein แทรกอยู่ภายในยีน

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่สร้างและเพิ่มจำนวนได้ดังขั้นตอนในข้อ 4.2.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปแทนที่ชิ้นยีน *gfp* ในพลาสมิด pMG241 ได้พลาสมิดชื่อ pMG241/C(I)*gfp* หรือพลาสมิด pAG121 จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α โดยวิธี chemical transformation ทำการคัดเลือก transformant ที่มีพลาสมิด pMG241/C(I)*gfp* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 μ g/ml จากนั้นทำการตรวจสอบว่าพลาสมิดที่ได้มียีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงหรือไม่ด้วยวิธี restriction analysis โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Pst*I และตรวจสอบขนาดของยีนโดยวิธี gel electrophoresis

6. การศึกษาหน้าที่และความสามารถของ DnaX intein ต่อกระบวนการ protein splicing ใน *E. coli* แบบ *in vivo*

6.1 การศึกษาหน้าที่ของ DnaX intein โดยการติดตามโปรตีน GFP ที่สร้างได้ภายในเซลล์ *E. coli* ภายใต้อุปกรณ์ fluorescent microscope

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pMG241/C(I)*gfp* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 μ g/ml อุณหภูมิ 37°C นำเซลล์ที่เลี้ยง มาตรวจสอบการสร้างโปรตีน GFP ภายในเซลล์ภายใต้กล้อง epifluorescent microscope (BX60, Olympus Japan) เทียบกับเซลล์แบคทีเรียควบคุมที่มีพลาสมิด pMG241 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *gfp* แต่ไม่มี *dnaX* intein

6.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่แยกได้จากเซลล์ *E. coli* โดยวิธี Western blot analysis

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pMG241/C(I)*gfp* และเซลล์แบคทีเรียควบคุมที่มีพลาสมิด pMG241 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ อุณหภูมิ 37°C ให้เติบโตจนถึงระยะ logarithmic ที่ $\text{OD}_{560} = 0.4$ จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ใน lysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 5 mM DTT และ 1mM PMSF) ในอัตราส่วนของเซลล์เปียก (wet cell) ต่อ lysis buffer = 1:1 ทำสารละลายเซลล์ให้เย็นในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นทำการแยกสารละลายเซลล์ที่มีโปรตีน (cell lysis) โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) 10 วินาทีสลับกับการแช่สารละลายเซลล์ในน้ำแข็ง 30 วินาที เป็นจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นปั่นตกตะกอนกากเซลล์ที่ความเร็ว 14,000 rpm และแยกสารละลายเซลล์ออกจากกากเซลล์เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์โปรตีนโดยวิธี Western blot analysis โดยอาศัย anti GFP เป็นตัวติดตามด้วยวิธี chromogenic detection

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

(Results and Discussion)

1. การศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ intein ของโปรตีน DnaX (DnaX intein) ของ *S. platensis* C1

ทำการศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ DnaX intein ของ *S. platensis* C1 โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน DnaX หรือ เอ็นไซม์ DNA polymerase III หน่วยย่อย gamma และ tau ของ *S. platensis* C1 และของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 มีความเหมือนกับโปรตีน DnaX ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ประมาณ 50 % และพบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ไว้ใน บริเวณ N-terminus ดังแสดงในรูปที่ 5 และพบว่าที่บริเวณ N-terminus ของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 และ ไซยาโนแบคทีเรียอื่นบางสายพันธุ์ เช่น *Cynotheca* sp. และ *Synechocystis* sp. ยังพบลำดับกรดอะมิโนที่เพิ่มเติม (extended region) เข้ามาในบริเวณนี้ ในขณะที่ไม่พบบริเวณดังกล่าวในโปรตีน DnaX ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. ซึ่งคาดว่าลำดับกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นน่าที่จะเป็นส่วนของ intein ที่สามารถพบได้เอ็นไซม์ DNA polymerase ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Elleuche and Pöggeler, 2010)

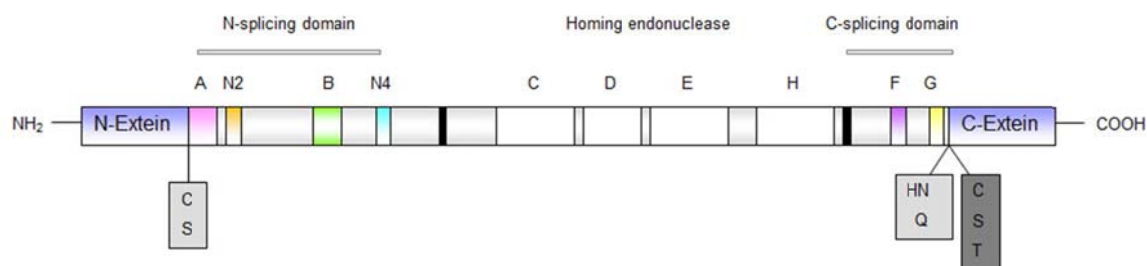
จากการวิเคราะห์หา conserved domain ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดว่าน่าจะเป็น intein ในโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 ด้วย NCBI conserved domain search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) พบว่าในบริเวณดังกล่าวแสดงลักษณะของ Hedgehog/Intein domain ซึ่ง domain ดังกล่าวมักพบได้ในโปรตีน Hedgehog และโปรตีนอื่นๆ ที่มี intein ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ protein splicing และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของบริเวณที่คาดว่าจะเป็ DnaX intein ของ *S. platensis* C1 ไปวิเคราะห์หา motif sequences ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการ protein splicing โดยการเปรียบเทียบกับ motif sequence ของ intein ที่ได้มีการเสนอไว้โดย Pietrokovski (1994; 1998) และ Perler *et al.* (1997) พบว่าในบริเวณดังกล่าวมี motif ที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิด protein splicing ทั้งหมด 6 motif คือ motif A, N2, B, N4, F และ G ซึ่ง motif ดังกล่าวปกติมักพบอยู่ใน splicing domain ของ intein ทั่วไป (รูปที่ 6) อย่างไรก็ตามพบลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับ endonuclease domain ที่พบใน intein บางชนิด แสดงว่า DnaX intein ของ *S. platensis* C1 ควรจะเป็น mini-intein ซึ่งเป็น intein ชนิดที่ไม่มี endonuclease domain (Paulus, 2000) นอกจากนี้ยังพบการอนุรักษ์ไว้ของกรดอะมิโน 4 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับ protein splicing ตำแหน่งแรก คือ กรดอะมิโน cysteine (C) ที่บริเวณ N-terminus ของ intein ตำแหน่งที่สองได้แก่ Asparagine (N) ซึ่งเป็น amino acid ตัวสุดท้ายของ intein ในบริเวณ C-terminus ตำแหน่งที่สามคือกรดอะมิโนตัวแรกของ downstream extein ซึ่งมีก่อนอนุรักษ์ไว้เป็น cysteine (C) และตำแหน่งสุดท้ายที่มีการอนุรักษ์ไว้ได้แก่ Histidine (H) ที่อยู่หน้า Asparagine (N) ที่มีการอนุรักษ์ไว้ในบริเวณ C-terminus ของ intein นอกจากทั้ง 4 ตำแหน่งดังกล่าวแล้ว ยังพบบริเวณ conserved sequence ของกรดอะมิโน T-x-

x-H อยู่ในบริเวณ motif B (รูปที่ 6) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า โปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 มีบริเวณที่มีคุณสมบัติเป็น mini-intein ที่ทำหน้าที่ในการเกิดกระบวนการ protein splicing

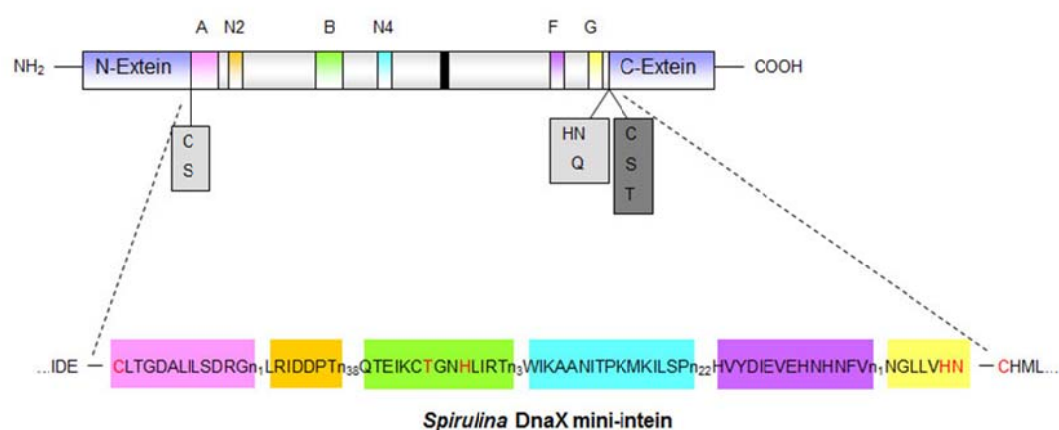
Spirulina	1	1	MYTEPLHHKYRPTQFADLVGQEAATTLTNARSRRAAPAVLFTGPRGTGKTSARILAKSLNCLQTSMPTEPCQIGEN
Cyanoeche	1	1	MYTEPLHHKYRPTQFADLVGQEAATTLTNARSRRAAPAVLFTGPRGTGKTSARILAKSLNCLQTSMPTEPCQIGEN
Synechocystis	81	1	MYTEPLHHKYRPTQFADLVGQEAATTLTNARSRRAAPAVLFTGPRGTGKTSARILAKSLNCLQTSMPTEPCQIGEN
Nostoc	1	1	MYTEPLHHKYRPTQFADLVGQEAATTLTNARSRRAAPAVLFTGPRGTGKTSARILAKSLNCLQTSMPTEPCQIGEN
Anabaena	1	1	MYTEPLHHKYRPTQFADLVGQEAATTLTNARSRRAAPAVLFTGPRGTGKTSARILAKSLNCLQTSMPTEPCQIGEN
Microcystis	1	1	MYTEPLHHKYRPTQFADLVGQEAATTLTNARSRRAAPAVLFTGPRGTGKTSARILAKSLNCLQTSMPTEPCQIGEN
Spirulina	81	81	CGRTGTEATLDVEIDAASNTGVNRIETLERTDSVPCVQKRYVYVYDCLTGDSALISDRGRLNLTQDQCEQRLVSN
Cyanoeche	81	81	CGRTGTEATLDVEIDAASNTGVNRIETLERTDSVPCVQKRYVYVYDCLTGDSALISDRGRLNLTQDQCEQRLVSN
Synechocystis	81	81	CGRTGTEATLDVEIDAASNTGVNRIETLERTDSVPCVQKRYVYVYDCLTGDSQGLTRMGLNSIDNPQIKGRLVSN
Nostoc	81	81	CGRTGTEATLDVEIDAASNTGVNRIETLERTDSVPCVQKRYVYVYDCLTGDSQGLTRMGLNSIDNPQIKGRLVSN
Anabaena	81	81	CGRTGTEATLDVEIDAASNTGVNRIETLERTDSVPCVQKRYVYVYDCLTGDSQGLTRMGLNSIDNPQIKGRLVSN
Microcystis	81	81	CGRTGTEATLDVEIDAASNTGVNRIETLERTDSVPCVQKRYVYVYDCLTGDSQGLTRMGLNSIDNPQIKGRLVSN
Spirulina	161	161	ESTQDQHEQVQLRMLDQGVETWKITFTGTECKTHNITDKMGKKAANTPKMKLSPEIDAQVKTALQDVESEIKL
Cyanoeche	161	161	ESTQDQHEQVQLRMLDQGVETWKITFTGTECKTHNITDKMGKKAANTPKMKLSPEIDAQVKTALQDVESEIKL
Synechocystis	161	161	ESTQDQHEQVQLRMLDQGVETWKITFTGTECKTHNITDKMGKKAANTPKMKLSPEIDAQVKTALQDVESEIKL
Nostoc	161	161	ESTQDQHEQVQLRMLDQGVETWKITFTGTECKTHNITDKMGKKAANTPKMKLSPEIDAQVKTALQDVESEIKL
Anabaena	161	161	ESTQDQHEQVQLRMLDQGVETWKITFTGTECKTHNITDKMGKKAANTPKMKLSPEIDAQVKTALQDVESEIKL
Microcystis	161	161	ESTQDQHEQVQLRMLDQGVETWKITFTGTECKTHNITDKMGKKAANTPKMKLSPEIDAQVKTALQDVESEIKL
Spirulina	241	241	DPSVLAGEVNDTCRSVLSRKPAMSTENIGRSIPTNPQTFNATAPVEKQGLNMLHRSGLSPVGVGVGSSGFNPISRTV
Cyanoeche	241	241	DPSVLAGEVNDTCRSVLSRKPAMSTENIGRSIPTNPQTFNATAPVEKQGLNMLHRSGLSPVGVGVGSSGFNPISRTV
Synechocystis	241	241	DPSVLAGEVNDTCRSVLSRKPAMSTENIGRSIPTNPQTFNATAPVEKQGLNMLHRSGLSPVGVGVGSSGFNPISRTV
Nostoc	241	241	DPSVLAGEVNDTCRSVLSRKPAMSTENIGRSIPTNPQTFNATAPVEKQGLNMLHRSGLSPVGVGVGSSGFNPISRTV
Anabaena	241	241	DPSVLAGEVNDTCRSVLSRKPAMSTENIGRSIPTNPQTFNATAPVEKQGLNMLHRSGLSPVGVGVGSSGFNPISRTV
Microcystis	241	241	DPSVLAGEVNDTCRSVLSRKPAMSTENIGRSIPTNPQTFNATAPVEKQGLNMLHRSGLSPVGVGVGSSGFNPISRTV
Spirulina	321	321	PVRLFRNTGAPTPIGKTRSKVSSVTPINMLFNLGQSAPAAVESATFPLLLKPPILQQRFP7GKNIQPKQITL6G
Cyanoeche	321	321	PVRLFRNTGAPTPIGKTRSKVSSVTPINMLFNLGQSAPAAVESATFPLLLKPPILQQRFP7GKNIQPKQITL6G
Synechocystis	256	256	PVRLFRNTGAPTPIGKTRSKVSSVTPINMLFNLGQSAPAAVESATFPLLLKPPILQQRFP7GKNIQPKQITL6G
Nostoc	256	256	PVRLFRNTGAPTPIGKTRSKVSSVTPINMLFNLGQSAPAAVESATFPLLLKPPILQQRFP7GKNIQPKQITL6G
Anabaena	256	256	PVRLFRNTGAPTPIGKTRSKVSSVTPINMLFNLGQSAPAAVESATFPLLLKPPILQQRFP7GKNIQPKQITL6G
Microcystis	256	256	PVRLFRNTGAPTPIGKTRSKVSSVTPINMLFNLGQSAPAAVESATFPLLLKPPILQQRFP7GKNIQPKQITL6G
Spirulina	381	381	LARLNDGASLRNLDQPTVPAEANDTFFHICMLSHPLQLQKLSTLGNLTPTKGTGSGTTEQKNISLTSQNYHQKQLND
Cyanoeche	381	381	LARLNDGASLRNLDQPTVPAEANDTFFHICMLSHPLQLQKLSTLGNLTPTKGTGSGTTEQKNISLTSQNYHQKQLND
Synechocystis	402	402	LARLNDGASLRNLDQPTVPAEANDTFFHICMLSHPLQLQKLSTLGNLTPTKGTGSGTTEQKNISLTSQNYHQKQLND
Nostoc	402	402	LARLNDGASLRNLDQPTVPAEANDTFFHICMLSHPLQLQKLSTLGNLTPTKGTGSGTTEQKNISLTSQNYHQKQLND
Anabaena	402	402	LARLNDGASLRNLDQPTVPAEANDTFFHICMLSHPLQLQKLSTLGNLTPTKGTGSGTTEQKNISLTSQNYHQKQLND
Microcystis	402	402	LARLNDGASLRNLDQPTVPAEANDTFFHICMLSHPLQLQKLSTLGNLTPTKGTGSGTTEQKNISLTSQNYHQKQLND
Spirulina	481	481	STAPFYMGIAPIFLPINTAAFGPDWGAATKNNENQSGKSPVSNHYDPSIGQHPKIAIQAQVCPSPVVPVLPNCEKSLR
Cyanoeche	481	481	STAPFYMGIAPIFLPINTAAFGPDWGAATKNNENQSGKSPVSNHYDPSIGQHPKIAIQAQVCPSPVVPVLPNCEKSLR
Synechocystis	336	336	STAPFYMGIAPIFLPINTAAFGPDWGAATKNNENQSGKSPVSNHYDPSIGQHPKIAIQAQVCPSPVVPVLPNCEKSLR
Nostoc	336	336	STAPFYMGIAPIFLPINTAAFGPDWGAATKNNENQSGKSPVSNHYDPSIGQHPKIAIQAQVCPSPVVPVLPNCEKSLR
Anabaena	336	336	STAPFYMGIAPIFLPINTAAFGPDWGAATKNNENQSGKSPVSNHYDPSIGQHPKIAIQAQVCPSPVVPVLPNCEKSLR
Microcystis	336	336	STAPFYMGIAPIFLPINTAAFGPDWGAATKNNENQSGKSPVSNHYDPSIGQHPKIAIQAQVCPSPVVPVLPNCEKSLR
Spirulina	561	561	SOLSKSPFHEISGSLNKLKQPGTQNNHMLVSVSWQLNSFTLHGLDKTLLPTGLLNIAQIPVPSGLPKA-FA
Cyanoeche	561	561	SOLSKSPFHEISGSLNKLKQPGTQNNHMLVSVSWQLNSFTLHGLDKTLLPTGLLNIAQIPVPSGLPKA-FA
Synechocystis	414	414	SOLSKSPFHEISGSLNKLKQPGTQNNHMLVSVSWQLNSFTLHGLDKTLLPTGLLNIAQIPVPSGLPKA-FA
Nostoc	414	414	SOLSKSPFHEISGSLNKLKQPGTQNNHMLVSVSWQLNSFTLHGLDKTLLPTGLLNIAQIPVPSGLPKA-FA
Anabaena	414	414	SOLSKSPFHEISGSLNKLKQPGTQNNHMLVSVSWQLNSFTLHGLDKTLLPTGLLNIAQIPVPSGLPKA-FA
Microcystis	414	414	SOLSKSPFHEISGSLNKLKQPGTQNNHMLVSVSWQLNSFTLHGLDKTLLPTGLLNIAQIPVPSGLPKA-FA
Spirulina	241	241	RVFTTSMNEQKQVGVNGLSNQISLQMLTLESIESIVTGTKEVYDLEVEDNNHNVANGLLAHMLCHLSTAFNALKL
Cyanoeche	241	241	RVFTTSMNEQKQVGVNGLSNQISLQMLTLESIESIVTGTKEVYDLEVEDNNHNVANGLLAHMLCHLSTAFNALKL
Synechocystis	640	640	RVFTTSMNEQKQVGVNGLSNQISLQMLTLESIESIVTGTKEVYDLEVEDNNHNVANGLLAHMLCHLSTAFNALKL
Nostoc	640	640	RVFTTSMNEQKQVGVNGLSNQISLQMLTLESIESIVTGTKEVYDLEVEDNNH

รูปที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบทึบแสดงถึงกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน ลำดับกรดอะมิโนที่แสดงโดยอักษรหนาหมายถึงลำดับกรดอะมิโนที่เพิ่มเติม (extend region) ของโปรตีน DnaX (putative DnaX intein) *Spirulina*, *S. platensis* C1; *Cyanothece*, *Cyanothece* sp. PCC 7425; *Synechocystis*, *Synechocystis* sp. PCC 6803; *Anabaena*, *Anabaena variabilis* ATCC 29413; *Microcystis*, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

Intein:



Mini-intein:

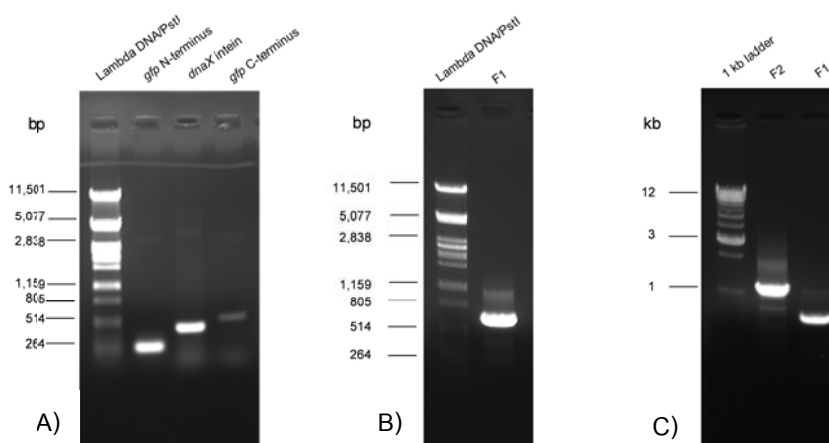


รูปที่ 6 โครงสร้างของ mini intein ของ โปรตีน DnaX ของ *S. platensis* C1 กรดอะมิโนที่อยู่ในกล่องสีต่างๆ คือบริเวณที่สันนิษฐานว่าเป็น motif ที่มีการอนุรักษ์ไว้ใน splicing domain โดยที่ motif A, N2, B, N4, F และ G ที่อนุรักษ์ไว้แสดงโดยกล่องสี ชมพู ส้ม เขียว ฟ้า ม่วง และเหลือง ตามลำดับ ตัวอักษรสีแดง หมายถึงกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein splicing ที่มีการอนุรักษ์ไว้

2. การสร้างพลาสมิดที่มียีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับเบสของ *dnaX* intein แทรกอยู่ภายในยีน

เพื่อที่จะสร้างพลาสมิดที่มียีน C(I) *gfp* ในเบื้องต้นได้ทำการดัดแปลงยีน *gfp* ให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ภายในยีน หรือ C(I) *gfp* โดยอาศัยเทคนิค fusion PCR ซึ่งเริ่มจากการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วน *gfp* N-terminus และ *gfp* C-terminus โดยใช้ พลาสมิดดีเอ็นเอ pMG241 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของ *dnaX* intein โดยใช้ดีเอ็นเอจากจีโนม ของ *S. platensis* C1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 257 550 และ 442 คู่เบสตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7 จากนั้นทำการสร้างดีเอ็นเอลูกผสม F1 ของ *gfp* N-terminus และ *dnaX* intein โดยใช้ดีเอ็นเอของ N-terminus ของ *gfp* และ *dnaX* intein ที่เพิ่มจำนวนได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเชื่อมต่อและเพิ่มจำนวน ด้วยเทคนิค fusion PCR ได้ผลิตภัณฑ์ของ F1 ขนาด 659 คู่เบส (รูปที่ 7B) จากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสม F1 ที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบร่วมกับ *gfp* C-terminus เพื่อสร้างดีเอ็นเอลูกผสม F2 หรือยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ภายในยีน (C(I)*gfp*) ด้วยเทคนิค fusion PCR ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1,173 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 7C

นำดีเอ็นเอลูกผสม F2 ที่สร้างและเพิ่มจำนวนไปแทนที่ชิ้นยีน *gfp* ในพลาสมิด pMG241 ได้พลาสมิด pMG241/C(I)*gfp* หรือพลาสมิด pAG121 จากนั้นนำพลาสมิดที่สร้างเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α และให้ชื่อว่า E241/C(I)*gfp* ซึ่งแบคทีเรียที่ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาความสามารถของ DnaX intein ของ *S. platensis* C1 ที่มีต่อกระบวนการ protein splicing ในขั้นตอนต่อไป

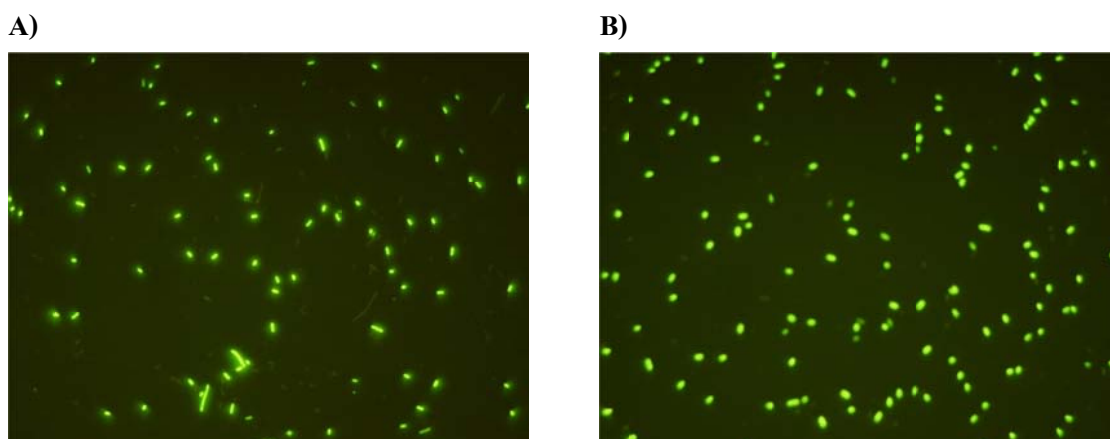


รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ภายในยีน

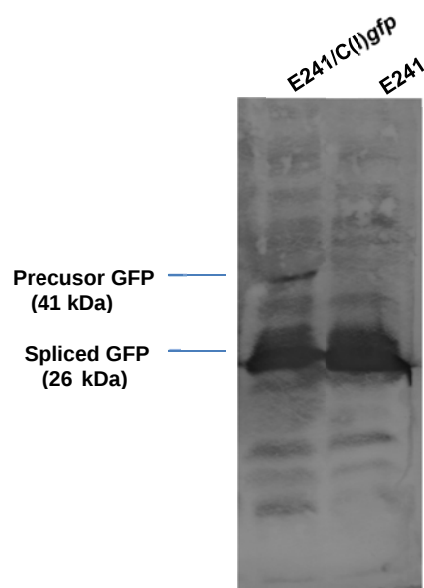
A) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในส่วน of *gfp* N-terminus *dnaX* intein และ *gfp* C-terminus B) ดีเอ็นเอลูกผสม F1 ของ *gfp* N-terminus และ *dnaX* intein C) ดีเอ็นเอลูกผสม F2 หรือยีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มี *dnaX* intein แทรกอยู่ภายในยีน (C(I)*gfp*) เทียบกับดีเอ็นเอลูกผสม F1

3. การศึกษาหน้าที่และความสามารถของ dnaX intein ต่อกระบวนการ protein splicing ใน *E. coli* แบบ in vivo

จากการตรวจสอบเซลล์แบคทีเรีย E241/C(I)*gfp* ที่มีพลาสมิด pMG241/C(I) *gfp* ซึ่งมียีน *gfp* ที่ถูกดัดแปลงให้มี dnaX intein ของ *S. platensis* C1 แทรกอยู่ในยีน ภายใต้กล้อง epifluorescent microscope พบว่าการเรืองแสงสีเขียวของโปรตีน GFP ที่สร้างภายในเซลล์ เช่นเดียวกับที่พบในเซลล์แบคทีเรียควบคุม E241 ที่มีพลาสมิด pMG241 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *gfp* ที่ไม่ได้ถูกดัดแปลง ดังแสดงในรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่า DnaX intein ที่แทรกอยู่ในโปรตีน GFP สามารถทำให้เกิดกระบวนการ protein splicing ทำให้ได้โปรตีน GFP ดั้งเดิมที่ (native GFP) ไม่มี DnaX intein แทรกอยู่ และเมื่อทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรีย E241/C(I)*gfp* เทียบกับผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรีย E241 โดยวิธี Western blot analysis โดยอาศัย anti GFP เป็นตัวติดตาม พบว่าได้ผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่มีขนาด 26 kDa เท่ากัน (รูปที่ 9) นอกจากนี้ยังพบว่า anti GFP สามารถจับผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 41 kDa ซึ่งสันนิษฐานว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีน GFP ที่ยังคงมี DnaX intein แทรกอยู่ใน (precursor GFP protein) เนื่องจากกระบวนการ protein splicing ยังเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ซึ่งจากผลของการทำ Western blot analysis นี้รวมกับการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่า DnaX intein ของ *S. platensis* C1 มีคุณสมบัติของ mini intein และมีความสามารถในการทำให้เกิดกระบวนการ protein splicing



รูปที่ 8 การเรืองแสงของโปรตีน GFP ภายในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* A) เซลล์แบคทีเรีย E241/C(I)*gfp* ที่มีพลาสมิด pMG241/C(I) *gfp* ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *gfp* ที่มี dnaX intein ของ *S. platensis* C1 แทรกอยู่ในยีน B) เซลล์แบคทีเรีย E241 ที่มีพลาสมิด pMG241 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน *gfp* ที่ไม่ได้ถูกดัดแปลง



รูปที่ ๑ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่แยกจากเซลล์แบคทีเรีย E241/C(I)gfp และแบคทีเรียควบคุม E241 โดยวิธี Western blot analysis

สรุป

จากการศึกษาคุณสมบัติและโครงสร้างของ DnaX intein ของ *S. platensis* C1 สามารถสรุปได้ว่า DnaX intein ของ *S. platensis* C1 มีคุณสมบัติเป็น mini intein ที่มี Hedgehog/Intein domain ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ protein splicing และมี motif sequences ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด protein splicing ทั้งหมด 6 motif คือ motif A, N2, B, N4, F และ G และจากการศึกษาความสามารถของ DnaX intein ดังกล่าวต่อการเกิดกระบวนการ protein splicing ในแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้โปรตีน GFP เป็นตัวแทนในการติดตามพบว่า DnaX intein ที่แทรกอยู่ภายในโปรตีน GFP สามารถเกิด protein splicing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่มีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ดั้งเดิมที่สามารถจับได้กับ anti GFP และผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ที่ได้ภายในเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวยังคงมีคุณสมบัติในการเรืองแสงสีเขียวเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์โปรตีน GFP ดั้งเดิมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการ protein splicing ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวทำให้สามารถสรุปได้ว่า DnaX intein ของ *S. platensis* C1 มีคุณสมบัติเป็น mini intein ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดกระบวนการ protein splicing

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

(References)

- Cooper, A.A., Chen, Y., Lindorfer, M.A. and Stevens, T.H. (1993) Protein splicing of the yeast TFP1 intervening protein sequence: a model for self-excision. *EMBO J.* 12:2575-2583.
- Davis, E.O., Jenner, P.J., Brooks, P.C., Colston, M.J. and Sedgwick, S.G. (1992) Protein Splicing in the Maturation of M. tuberculosis RecA Protein. *Cell* 71:201-210.
- Elleuche, S. and Pöggeler, S. (2010) Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:479-489
- Evans, T.C., Jr., Benner, J. and Xu, M.Q. (1999B). The Cyclization and Polymerization of Bacterially Expressed Proteins Using Modified Self-splicing Inteins. *J. Biol. Chem.* 274:18359-18363.
- Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. and Anraku, Y. (1990) Molecular Structure of a Gene, VMA1, Encoding the Catalytic Subunit of H⁺-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265:6726-33.
- Jeamton, W., Dulsawat, S., Laoteng, K., Tanticharoen, M. and Cheevadhanarak, S. (2011) Phycocyanin promoter of *Spirulina platensis* controlling heterologous expression in cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 23:83-88.
- Kane, P.M., Yamashiro, C.T., Wolczyk, D.F., Neff, N., Goebel, M. and Stevens, T.H. (1990) Protein Splicing Converts the Yeast TFP1 Gene Product to the 69-kD Subunit of the Vacuolar H⁺-Adenosine Triphosphatase. *Science* 250:651-657.
- Kim, S.B., Ozawa, T., Watanabe, S. and Umezawa, Y. (2004). High-throughput sensing and noninvasive imaging of protein nuclear transport by using reconstitution of split Renilla luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(32):11542-11547.
- Lew, B.M., Mills, K.V. and Paulus, H. (1999). Characteristics of protein splicing in trans mediated by a semisynthetic split intein. *Biopolymers.* 51(5):355-362.
- Liu, X.Q. (2000). PROTEIN-SPLICING INTEIN: Genetic Mobility, Origin, And Evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34:61-76.
- Liu, X.Q. and Yang, J. (2003). Split-dnaE genes encoding multiple novel inteins in *Trichodesmium erythraeum*. *J. Biol. Chem.* 278(29):26315-26318.

- Noren, C.J., Wang, J. and Perler, F. B. (2000). Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and its Applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39:450-466.
- Paulus, H. (2000). Protein Splicing and Related Forms of Protein Autoprocessing. *Annu. Rev. Biochem.* 69:447-496.
- Perler, F. B. (1998) Protein Splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function and evolution. *Cell* 92:1-4.
- Perler, F. B., Olsen, G. J. and Adam, E. (1997) Compilation and analysis of intein sequences. *Nucleic Acids Res.* 25:1087-93.
- Perler, F.B. and Adam, E. (2000). Protein Splicing and its Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:377-383.
- Petrokovski, S. (1998) Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains. *Protein Sci.* 7:64-71.
- Petrokovski, S. (1994) Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins. *Protein Sci.* 3: 2340-2350.
- Otomo, T., Teruya, K., Uegaki, K., Yamazaki, T. and Kyogoku, Y. (1999). Improved segmental isotope labeling of proteins and application to a larger protein. *J. Biomol. NMR.* 14:105-114.
- Ozawa, T., Nogami, S., Sato, M., Ohya, Y. and Umezawa, Y. (2000). A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing. *Anal. Chem.* 72:5151-5157.
- Ozawa, T., Kaihara, A., Sato, M., Tachihara, K. and Umezawa, Y. (2001). Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. *Anal. Chem.* 73:2516-2521.
- Xu, M., Southworth, M.W., Mersha, F.B., Hornstra, L.J., and Perler, F.B. (1993) In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell* 75:1371-77.