

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล

Production of Recombinant Transglutaminase from Nile Tilapia

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล

Production of Recombinant Transglutaminase from Nile Tilapia

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์เนตต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวอ้อมอุทัย คำผอง

นายอนันตศักดิ์ ลุนจันทา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544 - 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการวิจัยโปรตีน ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2545-2547

ผู้วิจัยขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยที่ได้อนุเคราะห์ปลูกปทานิลที่ราคาต้นทุน และในช่วงหลังคุณชนิศา กุประดิษฐ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ซื้อปทานิลสดจากตลาดเพื่อใช้ในการทดลอง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ และ คุณเสกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำการทำงาน อีกทั้งให้การสนับสนุนสารเคมีและห้องปฏิบัติการในการดำเนินงานวิจัยบางส่วน อ.ดร.มาโนชย์ สุธีรวุฒินานนท์ สำหรับสารเคมีบางตัว และคุณเพ็ญประภา ปิยะธรรม วิบูลย์ผู้ช่วยวิจัย ของ รศ.ดร.จิรวุฒน์ ยงสวัสดิกุล สำหรับคำแนะนำในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.นันทกร บุญเกิด ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัยโปรตีนที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และประสานงานชุดโครงการ

คณะผู้วิจัย

นางสาวอ้อมฤทัย คำผิง

นายอนันตศักดิ์ ภูจันทร์ทา

ผศ.ดร.มารีนา เกตุทัต-คาร์นส์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณลักษณะของยีนทรานสกลูตามิเนสในระดับโมเลกุล โดยการโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากตับปลานิล ซึ่งผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทรานสกลูตามิเนสพบว่ายีนมีขนาด 2,493 หรือ 2,594 นิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับขนาดของส่วน 3' UTR ยีนส่วนที่ถูกแปลรหัสมีขนาด 2,091 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 696 ตัว จากลำดับของกรดอะมิโนพบว่า มีความเหมือนกับทรานสกลูตามิเนสจาก ปลาดำแดงมากที่สุดคือ 78% ส่วนตัวเร่งประกอบด้วย Cys 272, His 332 และ Asp 355 ซึ่งเหมือนกับทรานสกลูตามิเนสจาก ปลาดำแดง โดยบริเวณจำเพาะของทรานสกลูตามิเนส จากทั้งปลานิล และปลาดำแดงเหมือนกันคือ Cys 272 น้ำหนักโมเลกุลของทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลที่ได้จากการคำนวณคือ 78.9 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.31 การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน *E. coli* โดยการโคลนรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสเข้าสู่ pET 32 (a) พลาสมิด และทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 20° C โดยการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนด้วย IPTG โปรตีนที่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์ ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้หลักการ incorporation ของ fluorescence amine (monodansylcadaverine) กับ N, N' dimethylcasein ผลปรากฏว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในการแสดงออกใน *E. coli* จึงทำการศึกษาในยีสต์ *P. pastoris* โดยการโคลน รีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสเข้าสู่ pPICZαB NH8 พลาสมิด และทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 20° C โดยการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนด้วย เมทานอล โปรตีนซึ่งผลิตออกมานอกเซลล์ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ผลปรากฏว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ทรานสกลูตามิเนสทั้งในระบบการศึกษาใน *E. coli* และ *P. pastoris* โดยจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน host ที่เหมาะสมต่อไป

Abstract

The cDNA encoding transglutaminase from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver was cloned and sequence. The cDNA sequence consists of 2,493 or 2,594 nucleotides depend on the 3' UTR. The cDNA encodes an open reading frame of 2,091 nucleotides coding for 696 amino acids. The amino acid sequence of Nile Tilapia liver TGase showed highest identity of 78% with TGase from red sea bream. The catalytic triad of Nile Tilapia TGase consists of Cys 272, His 332 and Asp 355 similar to the red sea bream TGase. The putative active site Cys 272 of the enzyme was conserved between the two species. The calculated molecular weight of Nile Tilapia TGase is 78.9 kDa with an isoelectric point of 6.31. Recombinant Nile Tilapia TGase was cloned in to pET 32 (a) plasmid and expressed in *E. coli* at 20° C, induction with IPTG. The total protein was extracted from cell pellet then purified with Ni-column. TGase activity was assayed by incorporation of fluorescence amine (monodansylcadaverine) into N, N' dimethylcasein. The result shows that TGase activity was not found in *E. coli* so the expression system was changed to yeast system. Recombinant TGase was cloned in to pPICZCB NH8 and expressed in *P. pastoris* at 20° C, induction with methanol. Toal protein in the medium was purified and enzyme activity was assay. But the result show that TGase activity was not found, so recombinant TGase was not produced in neither *E. coli* nor *P. pastoris* system.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
Abstract.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูปภาพ.....	จ
สารบัญคำย่อ.....	ฉ
บทที่ 1: บทนำ.....	1
บทที่ 2: งานวิจัยส่วนที่ 1 การโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล.....	8
บทที่ 3: งานวิจัยส่วนที่ 2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน <i>E.coli</i>	19
บทที่ 4: งานวิจัยส่วนที่ 3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน <i>P. pastoris</i>	26
บทที่ 5: บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	35
บรรณานุกรม.....	36
ภาคผนวก.....	39
ภาคผนวก ก โปสเตอร์เสนอผลงาน การประชุม BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand.....	40
ภาคผนวก ข บทคัดย่อ (Oral presentation) งานประชุมวิชาการ The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok Thailand.....	46
ภาคผนวก ค Submission ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล ในฐานข้อมูล NCBI.....	49
ประวัตินักวิจัย.....	52

สารบัญภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1 รูปที่ 1 การทำ alignment ของ PCR product ที่ได้จากการทำ 3' RACE	10
2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนทรานสกลูตามินเนสที่แปรมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์	15
3 แสดงผลการ alignment ของ ทรานสกลูตามินเนสจากปลานิล และปลาจาดแดง	16
4 แสดงผลการทำ multiple sequence alignment ของ ปลานิล, ปลาจาดแดง, ปลาแซลมอน, ปลาม้าลาย และ ไก่	18
5 ผลการ sequence เพื่อหา ลำดับเบสของยีนทรานสกลูตามินเนสใน pET พลาสมิด	20
6 ผลการทำ SDS –PAGE ของ soluble protein ที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์-ทรานสกลูตามินเนสใน <i>E. coli</i>	23
7 ผลการทำ SDS –PAGE ของ insoluble protein ที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์-ทรานสกลูตามินเนสใน <i>E. coli</i>	23
8 ผลการpurify sample protein ด้วย Ni-column	24
9 ผลการpurify control protein ด้วย Ni-column	25
10 ผลการ sequence เพื่อหา ลำดับเบสของยีนทรานสกลูตามินเนสใน pPICZαB NH8 พลาสมิด	28
11 ผลการทำ SDS –PAGE ของ โปรตีนที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ ทรานสกลูตามินเนสใน <i>P. pastoris</i>	29
12 ผล gel electrophoresis ในการตรวจสอบการสร้างทรานสกลูตามินเนส ในระดับ RNA	30
13 ผลการทำ SDS –PAGE ของ โปรตีนที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ ทรานสกลูตามินเนสใน <i>P. pastoris</i> ในระดับถึงหมัก	32
14 ผลการทำ Western blot	33

คำอธิบายสัญลักษณ์

<i>aox</i>	Alcohol oxidase gene
BMGY	Buffered glycerol complex medium
BMMY	Buffered methanol complex medium
cDNA	Complementary DNA
kDa	Kilodalton
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
SDS-PAGE	Sodiumdodisyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
TGase	Transglutaminase

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทรานสกลูตามิเนส (Transglutaminase, TGase) มีชื่อเรียกตามระบบตัวเลขคือ EC 2.3.2.13 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานสเฟอเรส (transferase) มีชื่อเรียกตามปฏิกิริยาว่า protein-glutamine γ -glutamyltransferase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิด ระหว่างกลูตามินในสายเปปไทด์ และสารประกอบเอมีน ในกรณีที่สารประกอบเอมีนเป็นหมู่เอปซิลอนอะมิโน (ϵ -amino group) ทราน-สกลูตามิเนส จะเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยงสายโปรตีนระหว่างกรดอะมิโนกลูตามิน (glutamine) และ ไลซีน (lysine) ทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ ϵ -(γ -glutamyl)lysine หรือพันธะ G-L ระหว่างสายโปรตีน ในสภาวะที่ไม่มีสารประกอบเอมีน ทรานสกลูตามิเนส จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกลูตามินในสายเปปไทด์ ได้เป็นอนุผลของกรดกลูตามิกและแอมโมเนีย

จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการนำเอาทรานสกลูตามิเนส มาประยุกต์ใช้กับกระบวนการแปรรูปอาหารประเภทโปรตีน ทรานสกลูตามิเนสถูกนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยงโปรตีน เช่นในหางนม (whey protein), โปรตีนถั่วเหลือง, โมโอซินและ แอคโตโมโอซิน เนื่องจาก ทรานสกลูตามิเนส สามารถปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีนเช่น ความสามารถในการเกิดเจล, ความหนืด, การทนต่ออุณหภูมิสูง, ความสามารถในการอุ้มน้ำ, การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ โดยการเชื่อมโยงโปรตีนจากแหล่งต่างๆที่ขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด (Nonaka และคณะ, 1996) และทรานสกลูตามิเนส ยังสามารถเชื่อมโยงกรดอะมิโนที่จำเป็นกับโปรตีนอื่นเพื่อป้องกันกรดอะมิโนจากการทำลายโดยกระบวนการ Millard reaction จะเห็นว่า ทรานสกลูตามิเนส ส่งผลต่อคุณภาพของอาหารประเภทโปรตีนทั้งทางด้าน เนื้อสัมผัส กลิ่น รส ให้ดีขึ้น

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ ทรานสกลูตามิเนส ในกระบวนการแปรรูปอาหารประเภทต่างๆ

1. ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

ทรานสกลูตามิเนส มีคุณสมบัติในการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีน จึงมีการนำเอา ทรานสกลูตามิเนส มาใช้ในการเชื่อมเสยขึ้นเนื้อที่ได้จากการตัดแต่งเนื้อสัตว์ เพื่อผลิตเนื้อขึ้นรูป (restructure meat) (Kennedy, 1999) ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเนื้อสัตว์ ที่เป็นวัตถุดิบราคาถูก ซึ่งแต่เดิมในการผลิตเนื้อขึ้นรูปจะมีการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับการให้ความร้อน หรือการแช่แข็ง แต่เอนไซม์ ทรานสกลูตามิเนส สามารถเชื่อมขึ้นเนื้อเล็กๆเข้าด้วยกันโดยไม่ต้องใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์และไม่ต้องให้ความร้อน หรือแช่แข็ง

2. ผลิตภัณฑ์นม

เคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนในนมจะไม่สามารถเกิดเจลโดยใช้ความร้อน แต่การเชื่อมพันธะ G-L ด้วย ทรานสกลูตามิเนส จะทำให้เคซีนสามารถเกิดเจลที่ทนความร้อนได้ดี และจาก

คุณสมบัติของ ทรานสกลูตามิเนส สามารถนำไปใช้แก้ปัญหาการแยกตัวของน้ำ (syneresis) ในการเก็บรักษาโยเกิร์ตได้เป็นอย่างดี เพราะ ทรานสกลูตามิเนส จะเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของโยเกิร์ตเจด จากการศึกษากของ Lorenzen (Lorenzen และคณะ, 2002) พบว่าโยเกิร์ตที่ผ่านการเติมทรานสกลูตามิเนส จะมีความแข็งแรงของเจดสูงขึ้น แต่การแยกตัวของน้ำลดลง

3. ผลกระทบขนมอบ

การเติม ทรานสกลูตามิเนส เพื่อเชื่อมพันธะ G-L ในโปรตีนของแป้งสาลีในระหว่างการเตรียมก้อนแป้งสำหรับผลิตขนมปัง จะทำให้ก้อนแป้งมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดียิ่งขึ้น ใช้พลังงานในการนวดผสมลดลง ปริมาตรของขนมอบเพิ่มขึ้นและมีเนื้อสัมผัสที่ดี (Bauer, 2003) และในผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลีเช่น เส้นก๋วยเตี๋ยวหรือเส้นพาสตา เมื่อนำมาผ่านการทำปฏิกิริยากับทรานสกลูตามิเนส จะช่วยป้องกันการสูญเสียเนื้อสัมผัสที่ดีหลังการปรุงแม้จะใช้แป้งที่มีคุณภาพต่ำก็ตาม (Sakamoto, 1996).

4. ผลกระทบจากถั่วเหลือง

ในการผลิตเต้าหู้จะต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนสูงด้วยกระบวนการสเตอริไรเซชัน เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา แต่ปัญหาที่พบคือความร้อนและความดันสูงที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะทำลายเนื้อสัมผัสของเต้าหู้ จากการศึกษากของ Motoki (Motoki และ Seguro, 1998) พบว่าเต้าหู้ที่ผ่านการผลิตจากน้ำนมถั่วเหลืองที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ ทรานสกลูตามิเนส จะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งแรงและทนต่อความร้อนและความดันสูง นอกจากนี้ทรานสกลูตามิเนสยังสามารถใช้ในการเชื่อมโยงโปรตีนถั่วเหลือง ให้ได้ฟิล์มที่มีความแข็งแรง ยืดหยุ่นอีกด้วย (Kurth และ Rogers, 1984)

5. ผลกระทบจากเนื้อปลา

ทรานสกลูตามิเนส มีบทบาทในการเกิดซูวาริ (suwari) (สุทรวัดน์ และ วรณพ, 2541) ซึ่งเป็นการจัดเรียงตัวกันของโมเลกุลของเนื้อปลา ณ อุณหภูมิ ที่ทำให้โปรตีนตกตะกอนสามารถเกิดที่อุณหภูมิต่างๆกันแต่ไม่เกิน 50 °C การเกิดซูวาริทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังจากการให้ความร้อนสูงมีลักษณะเนื้อละเอียด มีความเหนียว ความยืดหยุ่นดีขึ้น ทำให้ได้เนื้อปลาบดที่เกิดเจดโปรตีนคุณภาพสูงเพื่อใช้ในการผลิตซูริมิ (surimi) ซูริมิที่มีความยืดหยุ่นสูงสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารได้มากมาย เช่น ลูกชิ้น ไส้กรอก เนื้อกุ้งเทียม หอยเทียม เนื้อปูเทียม เป็นต้น ดังนั้นการเติม ทรานสกลูตามิเนส ในปลาบดจึงเป็นการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อปลาได้เป็นอย่างดี เพราะนอกจากจะเป็นการเชื่อมพันธะ G-L แล้วยังช่วยลดการสูญเสียเนื้อสัมผัสที่ดีและคุณค่าทางโภชนาการ อันเนื่องมาจากการละลายน้ำแข็งและการปรุงอาหารอีกด้วย

จาก Thai Trade Center เมือง Fukuoka ประเทศญี่ปุ่น ในเดือน มกราคม - ตุลาคมปี 2543 พบว่าประเทศญี่ปุ่นนำเข้าซูริมิจากประเทศไทย 2,601.8 ตัน หรือประมาณ 7.7 ล้านเยน (2.8 ล้านบาท) ซึ่งมีมูลค่าลดลงจากปี 2542 ที่มีมูลค่าการนำเข้าซูริมิ 10.3 ล้านเยน อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากผู้บริโภค

ที่หันไปซื้อซูริมิจากตลาดต่างประเทศที่มีราคาสูงกว่าซูริมิจากประเทศไทย ซึ่งเป็นการยากที่ประเทศไทยจะแข่งขันในด้านราคา เพราะมีต้นทุนและค่าแรงงานที่สูงกว่า ทางเลือกหนึ่งที่ทำให้คือการแข่งขันในด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ จึงควรมีการปรับปรุงคุณภาพสินค้าให้สูงขึ้น เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ทรานสกลูตามิเนส สามารถปรับปรุงคุณภาพของซูริมิได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการนำ ทรานสกลูตามิเนส มาใช้กับอุตสาหกรรมผลิตซูริมิ จึงน่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการปรับปรุงคุณภาพของซูริมิเพื่อการส่งออก

ทรานสกลูตามิเนส สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อและของเหลวของสัตว์ชั้นสูง เช่น ในอวัยวะส่วนต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ในตับ (Folk, 1980), รก (De Backer- Royer และคณะ, 1992) ในสัตว์ชั้นสูง ทรานสกลูตามิเนส จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับระบบต่างๆ ในร่างกาย เช่น การแข็งตัวของเลือด กระบวนการสร้างเซลล์ผิวหนัง, การควบคุมการเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Aeschlimann และ Paulsson, 1994) นอกจากนี้ยังพบ ทรานสกลูตามิเนส ในกล้ามเนื้อปลา และตับปลา (Yasueda และคณะ, 1994) ในพืชบางชนิด เช่น ในใบถั่วเหลือง (Kang และ Cho, 1996) และในจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Streptovorticillium* sp. strain S8112 (Zhu, et al., 1995) และ *Bacillus subtilis*.

เอนไซม์จากแต่ละแหล่งมีคุณสมบัติทางโมเลกุล (Molecular properties) แตกต่างกันไป โดยทั่วไป ทรานสกลูตามิเนสจำเป็นต้องใช้ Ca^{2+} ในการเร่งปฏิกิริยา (Ca^{2+} dependent enzyme) อย่างไรก็ตาม ทรานสกลูตามิเนส จากจุลินทรีย์ไม่จำเป็นต้องใช้ Ca^{2+} ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะที่แตกต่างจากทรานสกลูตามิเนสจากเนื้อเยื่อ ปัจจุบันทรานสกลูตามิเนสที่ใช้ในอุตสาหกรรมนั้นผลิตจากจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ แต่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศจึงมีราคาแพง

ในการศึกษาของ Worratao และ Yongsawatdigul (2005) พบว่า เนื้อปลานิลมี transglutaminase activity สูงสุดเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ โดย คิดเป็น 60.78 unit/g muscle ในขณะที่ activity ในปลายี่สกมีประมาณ 11.36 unit/g muscle และปลาช่อนมี activity ต่ำสุดเพียง 2.67 unit/g muscle และเมื่อคำนวณ specific activity ใน crude extract จากปลานิลพบว่ามีค่า 3.08 unit/mg protein ซึ่งมีมากกว่า crude extract ในหอยนางรมซึ่งรายงานโดย Kumazawa (Kumazawa, et al., 1997) ถึง 10 เท่า ดังนั้นปลานิลจึงเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ดี โดย ทรานสกลูตามิเนส จากปลานิลนั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยงโปรตีนกล้ามเนื้อได้เป็นอย่างดี ส่งผลให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลานิลบดมีความยืดหยุ่น (elastic) ดังนั้น ทรานสกลูตามิเนส จากปลานิลอาจสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโปรตีนอื่นๆ ได้เช่นเดียวกับ ทรานสกลูตามิเนส จากจุลินทรีย์ หากสามารถผลิตหรือสกัดได้ในเชิงอุตสาหกรรม

ข้อจำกัดของการสกัด ทรานสกลูตามิเนส จากปลานิลโดยตรงคือ ได้ปริมาณการเก็บเกี่ยว (recovery) ที่ต่ำ ซึ่งอาจไม่คุ้มค่ากับการลงทุนในระดับอุตสาหกรรม แต่ด้วยเทคโนโลยีการโคลนนิ่ง การผลิต recombinant enzyme มีความเป็นไปได้ และมีความท้าทายทางวิชาการอย่างมาก Yasueda,

และคณะ (1995) ได้ทดลองผลิต recombinant ทรานสกลูตามิเนส ของปลา red sea bream จากการ expression ใน *E.coli* ซึ่งพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีคุณสมบัติที่เหมือนกับ ทรานสกลูตามิเนส ที่ได้จากการสกัดจากปลา red sea bream โดยตรงและสามารถเชื่อมโยงแอกโตมัยโอซินในกล้ามเนื้อปลาได้เช่นกัน

การศึกษาการโคลนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล จะเป็นแนวทางที่จะพัฒนาไปสู่การผลิตเอนไซม์จากปลานิลในเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งจะเป็นการลดการพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเข้าใจในโครงสร้างของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสใน ระดับโมเลกุล อันจะนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกการเร่งปฏิกิริยาและคุณสมบัติทางโมเลกุลอื่นๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล
2. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน *Escherichia coli* และ ยีสต์ *Pichia pastoris*

ขอบเขตการวิจัย

โคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล โดยให้ยีนมีการแสดงออกในเซลล์ *E. coli* โดยใช้ pET พลาสมิด และการแสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* โดยใช้พลาสมิด pPICZαB NH8 ภายใต้การควบคุมของ *aox 1* promoter โดยเลี้ยงใน shake flask และทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ fluorescence spectrophotometer

วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยส่วนที่ 1 การโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล

1. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ cDNA

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ทรานสกลูตามิเนส จาก ปลาจันแดง (red sea bream), ปลาแซลมอน และจากกล้ามเนื้อปลานิล (*Loonchanta and Ketudat - Cairns, 2003*) โดยเลือกส่วนที่เป็น conserve region มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทรานสกลูตามิเนส (gene specific primer)

2. การสังเคราะห์ partial cDNA

สกัด Total RNA จากปลานิล จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA โดยการทำให้ RT-PCR เมื่อได้ partial cDNA แล้วจึงทำการ ligate เข้าสู่ cloning vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* strain

DH5 α คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสกลูตามิเนสแล้วจึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำ 3' และ 5' RACE เพื่อให้ได้ full length cDNA

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสกลูตามิเนส ทางด้าน 3'

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสกลูตามิเนส ทางด้าน 3' ด้วย 3' RACE method เมื่อได้ชิ้นยีนที่ต้องการแล้ว จึงทำการ ligate เข้าสู่ cloning vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ของยีน

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสกลูตามิเนส ทางด้าน 5' end

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสกลูตามิเนส ทางด้าน 5' ด้วย 5' RACE method เมื่อได้ชิ้นยีนที่ต้องการแล้ว จึงทำการ ligate เข้าสู่ cloning vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของยีน

5. การสังเคราะห์ full length cDNA

สังเคราะห์ full length cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' และ 3' ของยีน เมื่อได้ชิ้นยีนที่ต้องการแล้ว จึงทำการ ligate เข้าสู่ cloning vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแล้ว จึงเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ ยีนทรานสกลูตามิเนส จากแหล่งอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล

งานวิจัยส่วนที่ 2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน *Escherichia coli*

1. โคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลเข้าพลาสมิด pET 32 (a)

pET 32 (a) เป็นพลาสมิดสำหรับการผลิตโปรตีนใน *E. coli* โดยจะมี His tag ทั้งทางด้านปลาย N-terminal และ C-terminal และเป็นพลาสมิดที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter ซึ่งเป็น inducible promoter สามารถถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน ด้วย IPTG

ทำการโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลเข้าพลาสมิด pET 32 (a) โดย amplify full length cDNA ที่อยู่ใน pGEM-T-easy ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*NcoI*, *XhoI*) จากนั้นตัดทั้งพลาสมิด และ ยีนด้วย เอนไซม์ *NcoI*, และ *XhoI* และ นำพลาสมิดและยีนที่ตัดแล้วมาทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase ก่อนจะนำพลาสมิด pET 32 (a) ที่มีทรานสกลูตามิเนสยีนไป transform เข้า expression host เพื่อทำการผลิตโปรตีนต่อไป

2. การกระตุ้นให้ *E. coli* ผลิตทรานสกลูตามีนเนส

ทำการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ Roceta gami ซึ่งมี pET 32 (a) ทรานสกลูตามีนเนสอยู่แล้ว กระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ด้วย IPTG และลดอุณหภูมิการเลี้ยง *E. coli* จาก 37 °C เป็น 20 °C แล้วตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยหลักการ incorporation ของ fluorescence amine (monodansylcadaverine) กับ N, N' dimethylcasein และรัน โปรตีนบน SDS-PAGE

งานวิจัยส่วนที่ 3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามีนเนสจากปลานิลใน *Pichia pastoris*

1. โคลนยีนทรานสกลูตามีนเนสจากปลานิลเข้าพลาสมิด pPICZ α B NH8

pPICZ α B NH8 เป็นพลาสมิด pPICZ α B ที่มีการเพิ่ม 8-His tag เข้าไปทางด้าน N-terminal ที่ตำแหน่ง *Pst*I site จึงทำให้พลาสมิดมี His tag ทั้งทางด้านปลาย N-terminal และ C-terminal โดย pPICZ α B NH8 เป็นพลาสมิดที่มี *aox 1* promoter เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งเป็น inducible promoter สามารถถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน ด้วยเมทานอล

ทำการโคลนยีนทรานสกลูตามีนเนสจากปลานิลเข้าพลาสมิด pPICZ α B NH8 โดย amplify full length cDNA ที่อยู่ใน pGEM-T-easy ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Eco*RI, *Sac*II) จากนั้นตัดทั้งพลาสมิด pPICZ α B NH8 และ ยีนด้วย เอนไซม์ *Eco*RI, และ *Sac*II นำพลาสมิดและยีนที่ตัดแล้วมาทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase

2 นำพลาสมิดเข้าจีโนมยีสต์และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อได้พลาสมิด pPICZ α B NH8 ที่มียีนทรานสกลูตามีนเนสอยู่ จึงทำการตัดพลาสมิด pPICZ α B NH8 ด้วยเอนไซม์ *Pme*I เพื่อให้พลาสมิดสามารถ integrate เข้า จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ทรานสกลูตามีนเนสจากพลาสมิดได้สูงสุด

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ จะใช้หลักการ incorporation ของ fluorescence amine (monodansylcadaverine) กับ N, N' dimethylcasein โดยจะวัดการเพิ่มขึ้นของ fluorescence โดยใช้ fluorescence spectrophotometer ที่ excitation wave length 350 nm และ emission wave length 480 nm และทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์กับทรานสกลูตามีนเนสที่ผลิตเชิงการค้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถโคลนยีนทรานสกลูตามีนเนสจากปลานิล
2. สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามีนเนสจากปลานิลในปริมาณมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

3. ผลิคนักวิจัยที่มีความรู้ความสามารถซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทยต่อไปในอนาคต
4. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

งานวิจัยส่วนที่ 1

การโคลนยีนทรานสคริปต์จากปลา

2.1 การสังเคราะห์ partial cDNA

2.1.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ปลาที่ใช้ในการทดลองได้รับการสนับสนุนจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุปลาประมาณ 2-3 เดือน สกัดเอา Total RNA จากตับปลา จากนั้นนำมาสังเคราะห์สาย cDNA โดยการทำให้ RT-PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ เมื่อได้ partial cDNA แล้วจึงทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* strain DH5 α คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัด พลาสมิด เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสคริปต์จากตับปลาแล้วจึงออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อทำ 3' และ 5' RACE เพื่อให้ได้ full length cDNA ในขั้นต่อไป

2.1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองในระยะเริ่มแรกพบว่าได้ชิ้น PCR ที่มีขนาดใหญ่กว่าที่คาดไว้ค่อนข้างมาก เมื่อนำชิ้น PCR ที่ได้มาโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าชิ้น DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่าที่คาดไว้ เพราะเป็นส่วนของทรานสคริปต์ที่ยังไม่ได้ถูก splicing (มี intron อยู่) (Loonchanta and Ketudat-Cairns, 2003) ซึ่งความเป็นไปได้ อาจเกิดจาก 2 ประเด็นคือ DNA ชิ้นที่โคลนได้เป็น genomic DNA ไม่ใช่ cDNA หรืออีกประเด็นคือ mRNA จากกล้ามเนื้อปลาไม่ถูก splicing ออกทั้งหมดจริงๆ จึงได้ทำการเปลี่ยนการทดลองโดยเพิ่มขั้นตอนการ treat Total RNA ด้วย DNase และเริ่มการสังเคราะห์ cDNA จาก poly T primer ซึ่งจะทำให้จับกับ poly A tail ของ mRNA ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งที่บอกว่า mRNA นั้นจะถูกสังเคราะห์จนหมดสายแล้วน่าจะมีการ splicing ที่สมบูรณ์ แทนการใช้ไพรเมอร์ที่จับบริเวณกลางยีนเป็นตัวเริ่มต้นสังเคราะห์ first strand cDNA

จากการทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะและมีการ treat RNA ด้วย DNase เป็นอย่างดี จะได้ PCR product ชิ้นขนาด ประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ แล้วจึงทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* แล้วจึงคัดเลือกโคลนมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น PCR product ที่ได้ ประกอบด้วย 394 นิวคลีโอไทด์ และแปลเป็นกรดอะมิโน 128 ตัว เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับทรานสคริปต์อื่นในฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับทรานสคริปต์จากปลาจางแดงมากที่สุด คือ 84 เปอร์เซ็นต์

และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนหัวและท้ายเพื่อใช้ในการทำ 3' RACE และ 5' RACE ตามลำดับ

2.2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสคริปต์ทางด้าน 3' end

2.2.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสคริปต์ทางด้าน 3' end ด้วย 3' RACE method โดย สร้าง first strand cDNA ด้วยไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น poly T เพื่อจับกับ poly A tail ของ เส้น mRNA แล้วจึงสร้าง second strand cDNA ด้วย ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ partial cDNA เมื่อได้ชิ้นยีนที่ต้องการแล้ว จึงทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ของยีน

2.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการสังเคราะห์สาย cDNA โดยการทำให้ RT-PCR แบบ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ total RNA เป็นแม่แบบ ด้วยไพรเมอร์ที่เป็น poly T จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดย PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ โดยขึ้น PCR product ที่ได้มีลักษณะเป็นแบนคูมีขนาด ประมาณ 1.3 และ 1.4 กิโลเบส จึงสกัด DNA ทั้ง 2 แบน จากเจล แล้วทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector และ transform เข้า *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้

ผลจากการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของชิ้น PCR product ทั้ง 2 แบนพบว่าทั้ง 2 แบนคือ ทรานสคริปต์ยีนเหมือนกันแต่มีขนาดต่างกันในส่วนของ 3' UTR ซึ่งความต่างที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากกระบวนการ polyadenylation ซึ่งเป็นกระบวนการในการเติม poly A tail ในเส้น mRNA โดยการตัดเส้น mRNA จะอาศัยตำแหน่งที่เรียกว่า polyadenylation signal site เป็นตำแหน่งจดจำ แล้วจึงทำการตัดเส้น mRNA หลังตำแหน่งนี้ ก่อนจะทำการก่อนเติม poly A tail ซึ่งจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสคริปต์ยีนพบว่าประกอบด้วย polyadenylation signal site 2 ตำแหน่ง คือ AUUAAA และ AAUAUA โดยถ้าการ transcript ใช้ signal site AUUAAA เส้น mRNA จะถูกตัดหลังจากตำแหน่งนี้ 20 เบสแล้วจึงเติม poly A tail แต่ถ้า ใช้ signal site AAUAUA เส้น mRNA จะถูกตัดหลังจากตำแหน่งนี้ 15 เบสแล้วจึงเติม poly A tail ดังนั้นถ้า mRNA ถูกตัดหลังตำแหน่ง AAUAAA ก็จะได้ ชิ้น mRNA ที่มีขนาดสั้นกว่าการตัดที่ตำแหน่ง AAUAUA ดังรูปที่ 1

```

Larger band   TTTGCATTATTATATTTTGCATTTTGTTCGGTTTCACTGCGTTAGCGTCTCATTTCCTTA 1260
Smaller band  TTTGCATTATTATATTTTGCATTTTGTTCGGTTTCACTGCGTTAGCGTCTCATTTCCTTA 1189
*****

Larger band   CCTTTGACTTTTGTGTGTTGGTITTTCTGCTGAAATTTGGCCGCTGGCCGACAGTTTAGA 1320
Smaller band  CCTTTGACTTTTGTGTGTTGGTITTTCTGCTGAAATTTGGCCGCTGGCCGACAGTTTAGA 1249
*****

Larger band   GGTGAAAACGGTTTCTAATTAAAAGAAATTCGTGTTTTTGTGTAATTTTTGTGTTTGTGTT 1380
Smaller band  GGTGAAAACGGTTTCTAATTAAAAGAAATTCGTGTTTTTGTGTAATTTTTGTGTTTGTGTT 1309
*****

Larger band   TTCACTGTTTGTAATCACAAAAGTTCAAATGAATGCACTTTTATAATATTTGTGTTTTAGC 1440
Larger band   CAATATATAAAAACATATACAGAAAAA***** 1481

```

รูปที่ 1 ผลการทำ alignment ของ PCR product ที่ได้จากการทำ 3' RACE ซึ่งมีขนาดสั้นและยาวต่างกัน ตำแหน่งในช่องสี่เหลี่ยมคือ polyadenylation signal site

จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ แปลเป็นกรดอะมิโน 298 ตัวและเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับทรานสคริปโตตามีนชนิดอื่นในฐานข้อมูลพบที่มีความเหมือนกับทรานสคริปโตตามีนสจากปลาจันแดงมากที่สุด คือ 74 เปอร์เซ็นต์

2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสคริปโตตามีนส ทางด้าน 5' end

2.3.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนทรานสคริปโตตามีนส ทางด้าน 5' ด้วย 5' RACE method โดยใช้ ไพร์เมอร์จำเพาะที่ออกแบบจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ partial cDNA มาใช้ในการสร้าง first strand cDNA แล้วจึงนำ cDNA ที่ได้มาทำการกำจัดเอา dNTP ออก จากนั้นทำการต่อปลายทางด้าน 3' ของ cDNA ด้วย dCTP ด้วย เอนไซม์ TdT จากนั้น สร้างสาย second strand cDNA โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น poly G เพื่อให้จับกับ poly C ที่ต่ออยู่ทางด้านปลาย 3' cDNA เมื่อได้ชิ้นยีนที่ต้องการแล้ว จึงทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของยีน

2.3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

การสังเคราะห์สาย cDNA โดยการทำให้ RT-PCR ซึ่งใช้ total RNA เป็นแม่แบบ ด้วยไพร์เมอร์จำเพาะ แล้วจึงนำ cDNA ที่ได้มาทำการต่อ poly C ที่ปลายทางด้าน 3' ของ first strand cDNA จากนั้น สร้างสาย second strand cDNA โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น poly G เพื่อให้จับกับ poly C ที่ต่ออยู่ทางด้านปลาย 3' cDNA โดยขึ้น PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์

เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 1,200 นิวคลีโอไทด์ พบว่าสามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้เพียง 90 ตัว และ กรดอะมิโนที่ได้ก็ไปไม่ถึง 5' end ของยีนทรานสคริปตามีนสเมื่อเปรียบเทียบกับทรานสคริปตามีนสจากแหล่งอื่น จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้

เมื่อทำการสังเคราะห์ชิ้น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ใหม่ ได้ชิ้น PCR product ขนาด ประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถอ่านไปถึงลำดับทางด้าน 5' end ของยีนทรานสคริปตามีนส เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับทรานสคริปตามีนสชนิดอื่นในฐานข้อมูลพบว่ามี ความเหมือนกับทรานสคริปตามีนสจากปลาจางแดงมากที่สุด คือ 78 เปอร์เซ็นต์

ณ ขณะนี้ยังไม่สามารถตอบคำถามได้ว่าทำไมการทำ 5' RACE ในครั้งแรกจึงได้ชิ้น DNA ที่มีขนาด 1,200 นิวคลีโอไทด์แต่มีส่วนที่เป็นของยีนทรานสคริปตามีนสเพียง 270 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโนเพียง 90 ตัว แต่จากการศึกษาพบว่าการทำ 5' RACE แล้วส่วนใหญ่จะไม่สามารถสังเคราะห์ 5' product ได้ยาวกว่า 500 นิวคลีโอไทด์ จึงนับว่าเป็นความโชคดีที่ในการทำ 5' RACE ครั้งที่ 2 สามารถได้ชิ้น 5' cDNA ของทรานสคริปตามีนสได้สมบูรณ์ (เริ่มจาก ATG) ขนาด 700 นิวคลีโอไทด์

2.4 การสังเคราะห์ full length cDNA

2.4.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สังเคราะห์ full length cDNA เป็นการสังเคราะห์ยีนทรานสคริปตามีนสทั้งยีนด้วยไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' และ 3' ของยีน เมื่อได้ชิ้นยีนที่ต้องการแล้ว จึงทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* คัดเลือกโคลนที่ได้นำมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแล้วจึงเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ ยีนทรานสคริปตามีนส จากแหล่งอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล

2.4.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (ไม่รวมส่วนของ 3' UTR) จะได้ PCR product ขึ้นขนาด ประมาณ 2,100 นิวคลีโอไทด์ แล้วจึงทำการ ligate เข้าสู่ pGEM-T-easy vector จากนั้น transform เข้าไปยัง *E. coli* แล้วจึงคัดเลือกโคลนที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้

ผลจากการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์พบว่าทรานสคริปตามีนสยีนมีขนาด 2,493 หรือ 2,594 นิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับความยาวของส่วน 3' UTR ยีนส่วนที่ถูกแปลรหัสมีขนาด 2,091 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 696 ตัว จากลำดับของกรดอะมิโนพบว่า มีความเหมือนกับ

ทรานสกลูตามิเนสจาก ปลาจางแดง, ปลาแซลมอล, ปลาม้าลาย และไก่ อยู่ 78 เปอร์เซ็นต์, 59 เปอร์เซ็นต์, 59 เปอร์เซ็นต์ และ 41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4)

เมื่อทำการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนพบว่าส่วนหัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic triad) ประกอบด้วย Cys 272, His 332 และ Asp 355 (รูปที่2) ซึ่งเหมือนกับทรานสกลูตามิเนสจากปลาจางแดง โดยบริเวณจำเพาะ (active site) ของทรานสกลูตามิเนส จากทั้งปลานิล และปลาจางแดง เหมือนกันคือ Cys 272 (รูปที่3) แต่ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิล จะมีความแตกต่างจากปลาจางแดง เล็กน้อยในส่วนปลาย N-terminal และ C-terminal และพบว่าส่วนของ C-terminal ในปลานิลมีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นมา 1 ตัว น้ำหนักโมเลกุลของทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลที่ได้ จากการคำนวณ คือ 78.9 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.31 โดยเมื่อเทียบกับ ทรานสกลูตามิเนสที่ได้จากปลานิล โดยตรง พบว่ามี น้ำหนักโมเลกุล 85 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.53 (Worratao และ Yongsawatdigul , 2005)

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลแล้วจึงทำการ submit ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเข้าสู่ฐานข้อมูล NCBI โดยได้ accession number คือ QD480532 (ภาคผนวก ค)

DNA: TCATCACCAACTTCTCCTCAGCTCATGATGTCGATGGAAACCCCTCTATAG 969
 I T N F S S A H D V D G N P S I D 309

DNA: ACTTCCTGTTGGATGAAAACCTGCAACCATTGGAGAGCAGAGGAGGGAGAG 1020
 F L L D E N L Q P L E S R G G R D 326

DNA: ACAGCAGCTGGAATTTCCACTGCTGGGTGGAGTCTTGGATGAGGAGAGATG 1071
 .S S W N F H C W V E S W M R R D D 343

DNA: ATCTCCCCAAAGGAAATGATGGCTGGCAGGTTTTAGATCCCACCCCTCAAG 1122
 L P K G N D G W Q V L D P T P Q E 360

DNA: AACTCAGCAATGGGGTTTTCCGCTGTGGTCCGTGCCCTGTGACAGCCATCA 1173
 L S N G V F R C G P C P V T A I K 377

DNA: AGGAGGGAAATCTGGGAGTGAAGTACGATGCTCCGTTTTGTGTTTGCAGAGG 1224
 E G N L G V K Y D A P F V F A E V 394

DNA: TGAACGCTGACATCATCCACTGGATCGTTCAGAGAAATGGCCAACGGAGAA 1275
 N A D I I H W I V Q R N G Q R R K 411

DNA: AAATCAGAGTGGACCATGCCACTGTGGGTAGGAACATCAGCACCAAAGTG 1326
 I R V D H A T V G R N I S T K S V 428

DNA: TTTATGGGGACTTCAGAGATGATGTCACTCTGCACTACAAATATCCTGAAG 1377
 Y G D F R D D V T L H Y K Y P E G 445

DNA: GATCCAAGAAGGAGAGAGAAGTGTACGAGAAGGCCGGGGCGTCCGGTGACAG 1428
 S K K E R E V Y E K A G R R V T D 462

DNA: ATGTCCCCAGTGAGAGCTCAGAACCAGGACGACTGCAGCTGTCCATCAAGC 1479
 V P S E S S E P G R L Q L S I K H 479

DNA: ATGCCAAGCCTGTGTTTGGGACAGACTTTGATGTGATTATTGAGGTGAAGA 1530
 A K P V F G T D F D V I I E V K N 496

DNA: ATGAAGGAGACCAGGATGCTCATGTTTCAGCTGACCATGCTGGCTATGGCTG 1581
 E G D Q D A H V Q L T M L A M A V 513

DNA: TTACTTACAGCTCTCTTCATCGGGGGAAGTCCAGAGGCAGACCACCACTG 1632
 T Y S S L H R G N C Q R Q T T T V 530

DNA: TGATGGTGCCTGCTCACAAGCTCAGCAGGAAGTGCTGCGTCTGCGCTACG 1683
 M V P A H K A Q Q E V L R L R Y D 547

DNA: ATGACTATGCCAGTGTGTCTCAGACGATCATCTGATCAGGGTGAAAGCAT 1734
 D Y A Q C V S D D H L I R V K A F 564

DNA: TTGTAGAGGCTCCAGGCGAGAACGAGCCCCTCCTGACTGTGACTGACATCC 1785
 V E A P G E N E P L L T V T D I P 581

DNA: CACTCAGCAGACCTGAAGTCTTCATACAGGTTCCCTGGGAGGGCTTTTGTTT 1836
 L S R P E V F I Q V P G R A F V C 598

DNA: GTGAACAAGTAAAAGCTTCCATCTCCTTACCAATCCGTTACCAGTTCAC 1887

E Q V K A S I S F T N P L P V P L 615
 DNA: TGAAAGGAGGTGTGTTCACTCTGGAGGGTGCAGGCCTACTCTCTTCCACTA 1938
 K G G V F T L E G A G L L S S T K 632
 DNA: AGATCCATGTTAGTGGGGACATTTCTCCAGGACAGACGGTGTCCATTGTGG 1989
 I H V S G D I S P G Q T V S I V V 649
 DNA: TGTCCCTCTCACCCATGAGGACTGGGGTGAGGAAGCTGCTGGTGGACTTTG 2040
 S F S P M R T G V R K L L V D F D 666
 DNA: ACTCTGACCGACTGAAAGATGTAAAGGGAGTCACCCTGTGGTTCGTCGCA 2091
 S D R L K D V K G V T T V V V R K 683
 DNA: AGAAGTACAGAAATATCTTCCCTGAAATTACTGAATGTTATTAAGTAACCT 2142
 K Y R N I F P E I T E C Y * 696
 DNA: TTAAATAATCTGAGACAATGTGACGTGTCCCTGTGAGCGGATGAGCAATCGA 2193
 DNA: GCAATCAGCATGTATGTACAATAAAACATGTTCCACATACATCAGCCTGTG 2244
 DNA: AATGTCCACAAATACATCATGATAAAGCATTAGTTTGAAGCCACTATGTGT 2295
 DNA: CAGGTATGAACATTTCTGACTTTGCATTATTATATTTTGCATTTTGTTCG 2346
 DNA: GTTTCCTGCGTTAGCGTCTCATTCTTACCTTTGACTTTTGTGTTTGGT 2397
 DNA: TTTTCTGCTGAATTTTGGCGCCTGGCCGACAGTTTAGAGGTGAAAACGGTT 2448
 DNA: TCTAATTAAGAAATTCTGTTTTTGTGTTTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2493
 หรืออีกโคลนหนึ่ง
 DNA: similar to previous.... TTTTTTGTGTTTGTTCAT 2512
 DNA: CTGTTTGTAAATCACAAAGTTCAAATGAATGCACTTTTATAATATTTGTGTT 2563
 DNA: TTAGCCAATATATAAAAACATATACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2594

รูปที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของทรานสกลูตามิเนสที่แปลมาจากลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ โดยสามเหลี่ยมแสดงถึง ส่วนตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic triad) ของทราน-
 สกลูตามิเนส ซึ่งประกอบด้วย Cys 272, His 332 และ Asp 355 (▲)

```

Tilapia      MANHKGLISDVDLRSRENNSAHHTREIDQKRLIVRRGQPFSTLQCNGLRPRRHLDLVL 60
red          MASYKGLIVDVNGRSHENLAHRTREIDRERLIVRRGQPFSTLQCSDSLPPKHLELVL 60
           **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      HLGKRDEVEIKVQKERGAGDKWVFNQQAQDEMLLTLHSPADAIIGRYSLAVLLMSPDGR 120
red          HLGKRDEVVIKVQKEHGARDKWVFNQQAQDEILLTLHSPANAVIGHYRLAVLVMSPDGH 120
           ***** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      ILEKKDKMSFHLLYNPWCHDDVVYLPDETQLQEYIMNEDSIIYMGTW EYIKSTHWNYGQF 180
red          IVERADKISFHMLFNPWCHDDMVYLPDES KLEQYVMNEDSIIYMGTDYIRSI PWN YGQF 180
           *.:* **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      EDYVMDICFEVLNHSNDALRNSQMDIEQRFDPVYVSRIIAAMVNSNDRGVL TGRWTEPY 240
red          EDYVMDICFEVLDNSPAALKNSEMDIEHRSDPVYVGRITITAMVNSNGDRGVL TGRWEEPY 240
           ***** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      SDGVAPYQWTSVPILRQWSKAGVRAVKYQCCWVFAAVACTVLRCLGIPTRLI TNFSSAH 300
red          TDGVAPYRWTGSVPI LQQWSKAGVRPVKYQCCWVFAAVACTVLRCLGIPTRIP TNFASAH 300
           :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Tilapia      DVDGNPSIDFLLDENLQPLESRGGRDSSWNFHCWVESWMRRDDLPGKNDGWQVLDPTPQE 360
red          DVDGNLSVDFLLNERLESLSRQSRDSSWNFHCWVESWMSREDLPEGNDGWQVLDPTPQE 360
           ***** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      LSNVFRCCGFCPVTAIKEGNLGVYDAPFVFAEVNADI IHWIVQRNGQRKRIRVDHATVG 420
red          LSDGEFCCGFCPVAAIKEGNLGVYDAPFVFAEVNADTIYWI VQKDGQRKITE DHASVG 420
           **:* **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      RNI STKSVYGDFRDDVTLHYKYPEGSKKEREVEYKAGRRVTDVPSSESPEGR LQLSIKHA 480
red          KNI STKSVYGNHREDVTLHYKYPEGSQKEREVEYKAGRRVTEPSNEI AEQGR LQLSIKHA 480
           :*****:.*:*****:*****:*****:*****:..*:* *****

Tilapia      KPVEFGTDFDVIIEVKNEGDQDAHVQLTMLAMAVTYS LHRGNCQRQT TTVMVP AHKAQQE 540
red          QPVEFGTDFDVIIEVKNEGGRDAHAQVQLTMLAMAVTYS LRRGECQRKTI SVTVPAHKAHKE 540
           :*****:*****:***:*****:***:***:***:***:***:***:***:***

Tilapia      VLRLRYDDYAQCVSDDHLIRVKA FVEAPGENEPLLTVDIPLSRPEVFTI QVPGRAFVCEQ 600
red          VMRLHYDDYVRCVSEHHLIRVKALLDAPGENGPIMTVANIPLSTPELLVQVPGKAVVWEP 600
           *.:* **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:*** **.:***

Tilapia      VKASISFTNPLPVLKGGVFTLEGAGLLSSTKIHVSGDISPGQTVSIVVSFSPMRTGV RK 660
red          LTAYVSFTNPLPVLKGGVFTLEGAGLLSATQIHVNGAVAPSGKVSVKLSFSPMRTGV RK 660
           :.*:*****:*****:***:***:***:***:***:***:***:***:***

Tilapia      LLVDFDSDRLKDVKGVTTVVVRKKYRNI FPEITECY 696
red          LLVDFDSDRLKDVKGVTTVVVRKKYRSLITGLHTD- 695
           *****:*****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***
    
```

รูปที่ 3 แสดงผล alignment ของ ทรานสกลูตามินสจากปลานิล (การทดลองนี้) และปลาจันแดง (AAB35370) โดยสามเหลี่ยมแสดงถึง ส่วนตัวเร่ง (catalytic traid) ของทรานสกลูตามินส ซึ่งประกอบด้วย Cys 272, His 332 และ Asp ส่วนช่องที่เหลี่ยมแสดงถึง บริเวณ calcium binding site

Nile MANHK-----GLISDVDLRSRENNSAHHTREIDQK 30
red MASYK-----GLIVDVNGRSHENNAHRTREIDRE 30
chum MTDQN-----GVFMGMDLLCQVNSHAHRTTEEMDVE 30
zebrafish MAPQVSAGSPNAGSWRECRPSGASGGKRVQCQWLSSILSDVDLQCYENNAHRTTEEMDVE 60
chicken MAEEL-----VLETCDLQECERNGREHRTAEMGSQ 29
* : : : : * : * : * : : *

Nile RLIVRRGQPFSSITLQCNGSIR--PRHHLDLVLHLG-----KRDEVEIKVQKERGAGDKW 82
red RLIVRRGQPFSSITLQCSDSL--PKHHELVLHLG-----KRDEVVIVKQKEHGARDKW 82
chum RLLVRRGQPFSLALQCHTTLP--FKHKLAILHLG-----KEGEVVVKVLDARAGRDKW 82
zebrafish RLLVRRGQPFSSVVLQCTEQIPQLPDHQLNLHLG-----KNNEVVLKVSDEQDPGKW 114
chicken QLVVRRGQPFITLNFAGRGYEEGVKDLAFDVETGPCPVETSCTRSHFTLTDCEEGTWS 89
* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile WFNQOQAQDEMLLTLHSPADAIIGRYSLAVLLMSPDGRILEKKDKMSFHLLYNPWCKDDV 142
red WFNQOQAQDEMLLTLHSPANAVIGHYRLAVLVMSPDGHIVERADKISFHMFLNFWCRDDM 142
chum WFRQOQAQSEVILLTLHSPADAPVGLYSVTVLLSPDGHILEKTTPETFYLLFNFWCKADS 142
zebrafish WFSQRNAQGEVMLTLHSPADAPVGLYSMTVVLLSADGEIQEQTSPQTFYLLFNFWCKDDC 174
chicken AVLQQODGATLQVSLCSPSSARVGRYRLT--LEASTGYQSSFHLDGFVLLFNFAWHPEDA 147
* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile VYLPDETQLQEYIHNEDGIYMGTWVEYIKSTHWNVYGFEDYVMDICFEVLNNSNDALRNS 202
red VYLPDESKLQEYVMNEDGVIYMGTDWYIRSIPWNYGFEDYVMDICFEVLNNSPAALKNS 202
chum VYLPDEELLEVEYILNENGLLYQGSWDQISSLPWNFGQFEQDQVVDICFEILDNSPAALTNP 202
zebrafish VYLPSEEMLEVEYILNENGLLYQGAWDDITVPWNFGQFEKDVVDICFEILDNSPAALKNS 234
chicken VYLKEEDERREYVLSQQGLIYMGSRDYITSTPWNFGQFEDEILAICLEMLDINPKFLRDQ 207
* * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile QMDIEQRFDPVVYSRIIAAMVNSND--DRGVLTGRWTEPYSDGVAPYQWTSVPILRQWSK 261
red EMDIEHRSDPVVYGRITITAMVNSNG--DRGVLTGRWEEPYTDGVAPYRWTSVPILRQWSK 261
chum EMDTANRADPVVYSRTITAMVNSND--DLGVVSGRWDGKYDDGVPPTRWTSVPILRWSE 261
zebrafish EMDIFNRASPVVYSRTITAMVNSND--DRGVVSGRWDGEYSDGVAPTRWTSVPILRWSE 293
chicken NLDGSRNDPVYIGRVVSAHVNCDEDEHGVLLGRWNNHYEDGMSPHAWIGSDVILKRWR 267
* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile AGVRVAVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRLITNFSSAHDVDGNPSIDFLDENLQPLES 321
red AGVRPVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRPITNFASAHWDGNLSVDLFLNERLESLS 321
chum AGAQRVRYGCWVFSVACTVLRCLGIPTRPVITNYSAHDTDGNLNVDYLYDEQLESVSE 321
zebrafish DGGQKRVYGCWVFTGVACTVLRCLGIPTRCITNYSAHDTDANIAYDYLVNDQLESVSE 353
chicken LGCQPVKYGCWVFAAVACTVMRCLGVPSRVVITNYSAHDTNGNLVIDRYLSET--GME 325
* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile RGGRDSSWNFHCVWESWMMRRDDLPGNDGQVLDPTPQELSNVGFRCGPCPVTAIKEGNL 381
red RQRSDSSWNFHCVWESWMSREDLPEGNDGQVLDPTPQELSDGEFCGCPVAAIKEGNL 381
chum -GRKDMIWNYHCVWESWMDREDLPGYDQVLDPTPQERSDGYCCGCPVKAIVRCDGV 380
zebrafish -GRKDTIWNHCVWESWMKREDLPEGYDQVLDPTPQERSDGFICCGCPVRAVKEGEV 412
chicken RRTSDMIWNFHCVWECWMTRPDLAPGYDQVLDPTPQEKSEGVYCCGPAPVKAIKEGDL 385
* * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile GVKYDAPFVFAEVNADIHWIVQRNGQRRKIRVDHATVGRNISTKSVYGDVDFRDDVTILHYK 441
red GVKYDAPFVFAEVNADTIYVIVQKDGQRRKITEDHASVGNISTKSVYGNHREDVTILHYK 441
chum GMKYDAAFVSEVNADLVTVIVHPDQRSQVSLNQNTVGNISTKSVYGDYREDITKHYK 440
zebrafish GLKYDAAFVSEVNADLIWIVHPDGRSEVSQNSKIIGRKISTKSVYGDVDFREDITANYK 472
chicken QVQYDIPFVFAEVNADVYVIVQSDGEC--KKSTHSSVVGKNISTKSVGRDSREDITHYK 444
* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile YPEGSKKEREVVEYKAGRRVTDVPSSESSEPRQLQLSIKHAK--PVFGTDFDVIIEVKNEGDQ 500
red YPEGSQKEREVYKAGRRVTEPSNETAEQGRQLQLSIKHAQ--PVFGTDFDVIIEVKNEGGR 500
chum YPEGSVKEREVVEYKAGRQVTQPNGA---PGQLELIKHAQ--AILGTFDFDVIIEVHNVGG 496
zebrafish YPEGSMKEREVYKAGRQVQKQKDG---PGQLELFIKHAP--AIHGTFDFDVIIEVYNAGRE 528
chicken YPEGSEKEREVFSKAEHEKSSLGEQ---EGLHMRIKLEGANNGSDFDVFVAFISNDTDK 501
* * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Nile DAHVQLTMLAMAVTYSLSHRGNC--QRQTTVMVPAHKAQEQVLRRLRYDDYAQCVSDDHLI 559
red DAHAQLTMLAMAVTYSLSRRGEC--QRKTSVTVPAHKAHEVMRLHYDDYVRCVSEHHLI 559
chum DTPAQTLTVTSNAVITYNSLHRGEC--HRKTASLTVPQAQKAHEVLRRLRYDHYGACVSEHHLI 555
zebrafish DTDALQTLTVTSNAVITYNSIHRGEC--QRKTTSLTVPAYKAHEVLRRLQVDHYGACVSEHMI 587
chicken ERECLRLRCARTASVNGEVGPOCGPKDLLNLSLQPHMEQSVPLRILYEQYGNLTDQWMI 561
* : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Nile      RVKAFVEAPGENEFLITVTDIPLSRPEVFIQVPGRAFVCEQVKASISFTNPLPVFLKGGV 619
red       RVKALLDAPGENGFIMTVANIPLSTPELLVQVPGKAVVWEPLTAYVVSFTNPLPVFLKGGV 619
chum      RVTALLQVSGQPEVVLOEVNIQLSMPQLHVKVVGDAVVSRLIAHISFTNPLPITLRGGV 615
zebrafish RVTALLQPNDDNLILQETNIPLKMPALHVKIIIGNAIVSRKLTAHISFTNPLPINLQGGV 647
chicken   KVVALLTEYETGDSVVAIRDVVIQNPFIKIRIILGEPHQERKLVAEIRLVNPLAEFLNCCI 621
          :* *::      : : : : * : : : * . . . : * : : :****. * . . :

Nile      FTLEGAGLLSSTKIHVSGD--ISPGQTVSIVVSFSPMRTGVRKLLVDFDSDRLKDVKGVT 678
red       FTLEGAGLLSATQIHVNGA--VAPSGKVSVKLSFSPMRTGVRKLLVDFDSDRLKDVKGVT 678
chum      FTVEGAGLTAAREIQAPDD--IGPGQEVKVKLSFKPTRAGLRKLNWDFDADRIRDVKGIA 674
zebrafish FTVEGAGLTEAREIKTHGK--IESGQTVTVKFSFKPTRAGLRKLLVDFDSDRLRDVKGEAS 706
chicken   FVVEGAGLTEGQRIEELEDFVEPQAEAKFRMEFVPRQAGLHKLNVDFESDKLTGVKGYRN 681
          * : :***** . . : * . . . . . . . . * : : * : :***** : : : :*****

Nile      VVVRKKYRNIFPEITECY----- 696
red       VVHKKYRSLITGLHTD----- 695
chum      LIVRNK----- 680
zebrafish VIVRTRMRHSPVKNGTSMDSLLTAAQIREKFIDFFRRHEHQVYVHSSATIPLDPTLLFAN 766
chicken   VIIAFLPK----- 689
          : : :

```

รูปที่ 4 แสดงผลการทำ multiple sequence alignment ของ ปลาไน, ปลากานแดง, ปลาแซลมอน ปลาฆ่าตาย และ ไก่ ตามลำดับ โดยสามเหลี่ยมแสดงถึง ส่วนตัวเร่ง (catalytic traid) ของ ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งประกอบด้วย Cys 272, His 332 และ Asp

บทที่ 3

งานวิจัยส่วนที่ 2

การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากพลาสมิดใน *Escherichia coli*

3.1 โคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากพลาสมิดเข้าพลาสมิด pPET 32 (a)

3.1.1 วิธีการทดลอง

โคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากพลาสมิดเข้าพลาสมิด pET 32 (a) โดย amplify full length cDNA ที่อยู่ใน pGEM-T-easy (cloning vector) ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่เชื่อมต่อกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*NcoI*, *XhoI*) จากนั้นตัดทั้งพลาสมิด pET 32 (a) และ ยีนด้วย เอนไซม์ *NcoI* และ *XhoI* นำพลาสมิดและยีนที่ตัดแล้วมาทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase แล้วจึง transform เข้า *E.coli* strain Top 10 โดยทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่าย พลาสมิด บน LB plate ที่มี ampicillin ผสมอยู่ คัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายยีนไปหาลำดับเบสเพื่อเช็คว่าเกิดการเชื่อมต่อกันของยีนและ พลาสมิดในตำแหน่งที่ถูกต้อง และถูก reading frame โดยใช้ ไพรเมอร์ T7 promoter และ T7 terminator ในการ sequence

ทำการ transform ทรานสกลูตามิเนสในพลาสมิด pET เข้า expression host (origami) โดยทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด บน LB plate ที่มี ampicillin + kanamycin + tetracycline

3.1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการ amplify full length cDNA ที่อยู่ใน pGEM-T-easy ด้วย ไพรเมอร์จำเพาะจะได้ PCR product ขึ้นขนาด 2.1 กิโลเบส หลังจากการตัดทั้งพลาสมิด pET และ ยีนด้วย เอนไซม์ *NcoI*, และ *XhoI* นำพลาสมิดและยีนที่ตัดแล้วมาทำการเชื่อมต่อกัน แล้วจึง transform เข้า *E.coli* ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดโดยการทำ colony PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะเมื่อได้โคลนที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปจึงทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการหาลำดับเบสพบว่ายีนทรานสกลูตามิเนสได้เชื่อมต่อเข้ากับ pET ได้ถูก reading frame (รูปที่5) จากนั้นจึงทำการ transform ทรานสกลูตามิเนสในพลาสมิด pET เข้า expression host (origami) เพื่อผลิตทรานสกลูตามิเนสใน *E. coli* ต่อไป

His-tag

CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT TCT
 TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT AAA
 TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT GAC GAC GAC GAC
 AAG GCC ATG GCC AAC CAC AAA GGT TTG ATT AGT GAT CTG GAT CTC AGA
 AGT CGC GAG AAC AAC TCC GCA CAC CAC ACC AGG GAG ATC GAT CAA AAG
 CGT TTG ATT GTC CGT AGG GGT CAG CCC TTC TCC ATC ACT CTG CAG TGT
 AAT GGC TCT TTG CGC CCC AGA CAC CAC TTG GAT CTG GTC CTG CAC CTC
 GGT AAG ACA GAC GAG GTG GAG ATC AAG GTT CAG AAG GAG CGT GGA GCT
 GGG GAC AAG TGG TGG TTT AAC CAG CAG GGA GCA CAA GAT GAA ATG CTG
 CTG ACT CTG CAG AGT CCA GCT GAT GCT ATA ATT GGC GGC TAC AGT CTG
 GCT GTG CTG CTG ATG TCA CCG GAC GGA CGC ATT TTA GAC AAA AAG GAC
 AAA ATG AGT TTC CAC CTG CTC TAT AAC CCC TGG TGG AAA GAT GAT GTG
 GTG TAC CTG CCC GAC GAG ACC CAG CTT CAG GAG TAC ATC ATG AAC GAA
 GAC GGA ATA ATC TAC ATG GGC ACC TGG GAA TAC ATC AAA AGC ACT CAC
 TGG AAT TAT GGA CAG TTT GAG GAC TAT GTG ATG GAC ATC TGT TTT GAA
 GTC CTG AAT AAC TCC AAC GAT GCT CTG CGA AAC TCA CAG ATG GAC ATT
 GAG CAG AGA TTT GAC CCC GTC TAT GTC AGC AGG ATC ATC GCT GCA ATG
 GTG AAC TCT AAT GAT GAC AGA GGA GTG CTG ACT GGG CCC TGG ACT GAG
 CCG TAC TCT GAT GGA GTT GCA CCG TAC CAG TGG ACC GGC ACC GTA CCG
 ATC CTC CGT CAG TGG AGC AAA GCT GGG GTC AGA GCA GTG AAA TAT GGC
 CAG TGC TGG GTG TTT GCT GCT GTT GCA TGT ACA GTG CTG CCC TGT CTG
 GGA ATC CCA ACA CCG CTC ATC ACC AAC TTC TCC TCA GCT CAT GAT GTC
 GAT GGA AAC CCC TCT ATA GAC TTC CTG TTG GAT GAA AAC CTG CAA CCA
 TTG GAG AGC AGA GCA GGG AGA GAC AGC AGC TGG AAT TTC CAC TGG TGG
 GTG GAG TCT TGG ATG AGG AGA GAT GAT CTC CCC AAA GCA AAT GAT GGC
 TGG CAG GTT TTA GAT CCC ACC CCT CAA GAA CTC AGC AAT GGG GTT TTC
 CGC TGT GGT CCG TGC CCT GTG ACA GCC ATC AAG GAG GGA AAT CTG GGA
 GTG AAG TAC GAT GCT CCC TTT CTG TTT GCA CAG GTG AAC GCT GAC ATC
 ATC CAC TGG ATC GTT CAG AGA AAT GGC CAA CCG AGA AAA ATC AGA GTG
 GAC CAT GCC ACT GTG GGT AGG AAC ATC AGC ACC AAA AGT GTT TAT GGG
 GAC TTC AGA GAT GAT GTC ACT CTG CAC TAC AAA TAT CCT GAA GGA TCC
 AAG AAG GAG AGA GAA GTG TAC GAG AAG GCG GGG CGT CCG GTG ACA GAT
 GTC CCC AGT GAG AGC TCA GAA CCA GGA CCA CTG CAG CTG TCC ATC AAG
 CAT GCC AAG CCT GTG TTT GGG ACA CAC TTT GAT CTG ATT ATT GAG GTG
 AAG AAT CAA GGA CAC CAG GAT GCT CAT GTT CAG CTG ACC ATG CTG GCT
 ATC GCT GTT ACT TAC AGC TCT GTT CAT CCG GGG AAC TGC CAG AGG CAG
 ACE ACC ACT GTG ATG GTG CCT GCT CAC AAA GCT CAG CAG GAA GTG CTG
 CGT CTG CCG TAC GAT GAC TAT GCC CAG TGT GTC TCA GAC GAT CAT CTG
 ATC AGG GTG AAA GCA TTT GTA GAG GCT CCA CCG GAG AAC GAG CCC CTC
 CTG ACT GTG ACT GAC ATC CCA CTC AGC AGA CCT GAA GTC TTC ATA CAG
 GTT CCT GGG AGG GCT TTT GTT TGT GAA CAA GTA AAA GCT TCC ATC TCC
 TTC ACC AAT CCG TTA CCA GTT CCA CTG AAA GGA GGT GTG TTC ACT CTG
 GAG CGT GCA GGC CTA CTC TCT TCC ACT AAG ATC CAT GTT AGT GGG CAC
 ATT TCT CCA GGA CAG ACC GTG TCC ATT GTG GTG TCC TTC TCA CCC ATG
 AGG ACT GGG GTG AGG AAG CTG CTG GTG GAC TTT GAC TCT GAC CGA CTG
 AAA GAT GTA AAG GCA GTC ACC ACT GTG GTC GTC CGC AAG AAG TAC AGA
 AAT ATC TTC GCT GAA ATT ACT GAA TGT TAT CTC GAG CAC CAC CAC CAC
 CAC CAC ACT GAG ATC CCG TGC TAC AAA GCC GGA GAG GAT

His-tag

รูปที่ 5 ผลการ sequence เพื่อหา ลำดับเบสของยีนทรานสกลูตามิเนสใน pET พลาสมิดโดยลำดับ
นิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมคือลำดับเบสของทรานสกลูตามิเนส

3.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามินใน *E. coli*

3.2.1 วิธีการทดลอง

เลือกโคลนที่มีทรานสกลูตามินสียีนมาทำการศึกษการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามินใน *E. coli* จำนวน 2 โคลน นำโคลนที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร LB + ampicillin ปริมาตร 3 ml เพื่อใช้เป็น starter เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ° C, 200 rpm ข้ามคืน ก่อนจะนำ 1 % starter ที่ได้มาในลงในอาหาร LB + ampicillin ปริมาตร 15 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ° C, 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เจริญอย่างเต็มที่ แล้วจึง induce ด้วย 1 mM IPTG จากนั้นเพื่อให้โปรตีนที่ได้ folding อย่างถูกต้อง จึงปรับลดอุณหภูมิมาเป็น 20 ° C โดยเลี้ยงข้ามคืน ก่อนจะทำการเก็บเซลล์

3.2.1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการเลี้ยงโคลนที่ได้โดยเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์กับ control ซึ่งเป็น origami ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดเปล่าที่ไม่มีการตัดต่อจิ้นยีนเข้าไปเพื่อเป็นตัวควบคุม โดยเลี้ยงในอาหาร LB+ ampicillin เพื่อให้เชื้อเจริญ ก่อนจะ induce ด้วย IPTG เซลล์ที่ได้จะถูกนำมาแช่เยือกแข็งที่ -70 ° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงถูกนำมา break cell แยกเอาส่วน Soluble และ Insoluble มาตรวจวัด กิจกรรมของเอนไซม์และทำ SDS-PAGE เนื่องจากการสร้างพลาสมิด pET-TGase ควรจะมีการสร้าง recombinant โปรตีนภายในเซลล์ มิได้ส่งออกมานอกเซลล์ จึงทำการเก็บเฉพาะเซลล์และทำการทดลองโดยทำให้เซลล์แตกแล้วเก็บโปรตีนจากส่วน Soluble และ Insoluble มาหา กิจกรรมของเอนไซม์

3.2.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.2.2.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm , 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ° C นำตะกอนเซลล์ที่ได้แช่ที่ -70 ° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม breaking buffer เพื่อละลายเอาตะกอนเซลล์ขึ้นมา จากนั้นนำไป sonicate เพื่อให้เซลล์แตก แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลว (Soluble) ออกจากตะกอนเซลล์ (Insoluble) ก่อนจะนำทั้งสองส่วนมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ใน reaction ที่จะใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ประกอบด้วย 15 μ M monodansylcadaverine , 1 mg/ml N-N' dimethylcasein, 3 mM DTT, 70 mM Tris-Hcl pH 7.5, 5 mM CaCl₂, ปั่น reaction ที่ 37 ° C 5 นาที จากนั้นเติม เอนไซม์ที่ต้องการวัด 100 μ l ก่อนนำไปปั่นที่ 37 ° C, 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 5 mM EDTA ก่อนนำไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ จะใช้หลักการ incorporation ของ fluorescence amine (monodansylcadaverine) กับ N, N' dimethylcasein โดยจะวัดการเพิ่มขึ้นของ fluorescence โดยใช้ fluorescence spectrophotometer ที่ excitation wave length 350 nm และ emission wave length 480 nm

3.2.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าทรานสกลูตามิเนสที่ผลิตได้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเทียบกับ control คือทั้งในตัวอย่างและ control ให้ผลไม่ต่างกันจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ด้วย SDS-PAGE ต่อไป

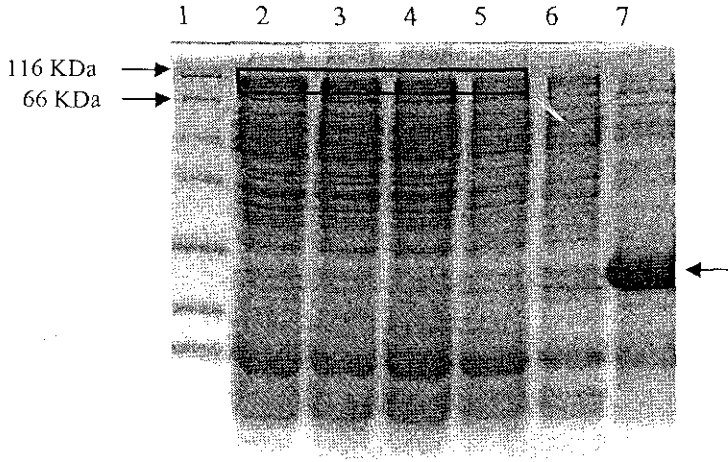
3.2.3 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.2.3.1 วิธีการทดลอง

นำ โปรตีนส่วน Soluble และ Insoluble มาผสมกับ dye + mercaptoethanol ก่อนนำไปต้มที่ 100 ° C, 10 นาที แล้วโหลดบน 15 % SDS-PAGE ที่เตรียมไว้ โดยรันที่ 120 โวลต์ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาย้อม ด้วย coomassie blue ค้างคืน และล้างสีย้อม เป็นเวลา 30 min

3.2.3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

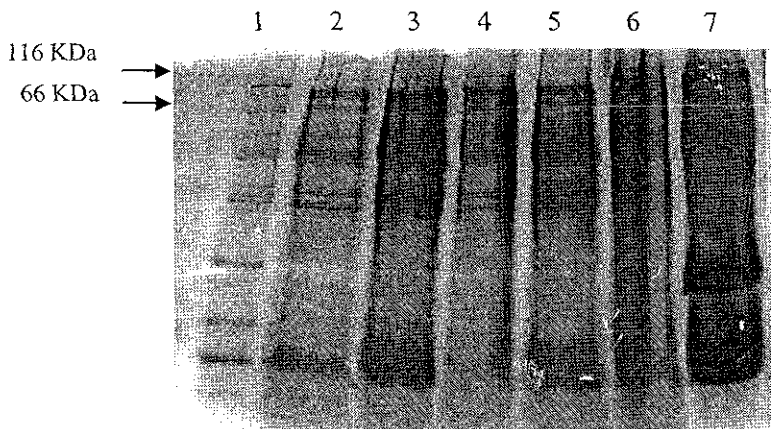
จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ถ้ามีการผลิตโปรตีนจะได้แถบที่มีขนาดประมาณ 110 KDa (ทรานสกลูตามิเนส 87.9 KDa + thioredoxin band 22 KDa) ซึ่งผลการทดลอง (รูปที่ 6) พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีขนาดดังกล่าวอยู่ในส่วนที่เป็น Soluble protein (กรอบสี่เหลี่ยม) และพบแถบของ thioredoxin ขนาด 22 KDa ใน induction control (ลูกศรชี้)



รูปที่ 6 ผลการทำ SDS -PAGE ของ soluble protein ที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน *E. coli*. 1; protein marker. 2; โคลน1 un-induce. 3; โคลน1 induce. 4; โคลน2 un-induce. 5; โคลน2 induce 6; control un-induce. 7; control induce

แต่ผลที่ได้พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับแถบโปรตีนที่สนใจทั้งใน un-induce และ induce (lane 2-5) แต่ไม่พบแถบนี้ใน control ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจาก leak ของ promoter ที่ใช้ ส่วนแถบที่พบใน control คือ thioredoxin band ซึ่งเป็นตัว control ทำให้ทราบว่าระบบการผลิตโปรตีนของเวกเตอร์นั้นถูกต้อง

ในส่วนของ insoluble นั้นพบว่า มีแถบของโปรตีนที่สนใจแต่น้อยกว่าใน soluble



รูปที่ 7 ผลการทำ SDS -PAGE ของ insoluble protein ที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน *E. coli* 1; protein marker. 2; โคลน1 un-induce. 3; โคลน1 induce. 4; โคลน2 un-induce. 5; โคลน2 induce 6; control un-induce. 7; control induce

จากผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ทั้ง soluble และ insoluble protein เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าแถบที่ได้เป็นแถบของโปรตีนที่สนใจจริงจึงทำการ purify protein โดยผ่าน Ni-column โดยอาศัยการ bind ของ Ni-column กับ His-tag ที่อยู่ทั้งทางด้าน N-terminal และ C-terminal ของโปรตีน

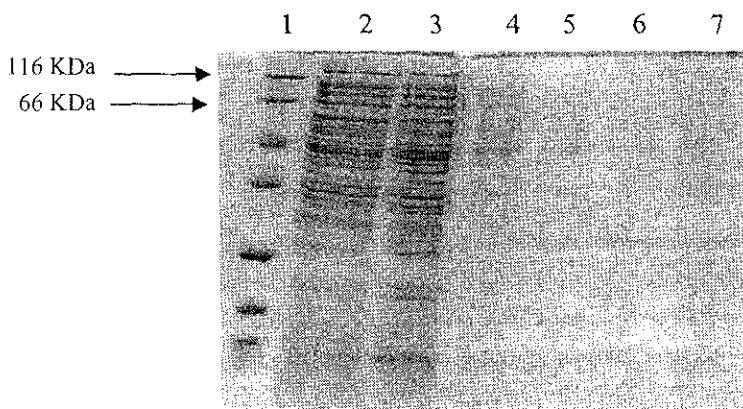
3.2.4 การ Purify โปรตีน โดยการใช้ Ni-column

3.2.4.1 วิธีการทดลอง

ทำการ equilibrate Ni-column ด้วย equilibrate buffer (50 mM Tris-Cl pH 8+ 150 mM NaCl) จากนั้นนำส่วน soluble protein มาทำการไหลผ่าน column ส่วนที่ผ่าน column ออกมาคือส่วน flow through จากนั้นจึงล้าง column ด้วย wash buffer (50 mM Tris-Cl pH 8+ 150 mM NaCl+ 10mM imidazole) ในขั้นสุดท้ายจะเอาโปรตีนออกจาก column ด้วย elution buffer (50 mM Tris-Cl pH 8+ 150 mM NaCl+ 250 mM imidazole) โดยแยกเก็บโปรตีนที่ถูกชะออกมาเป็น fraction ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ต่อไป

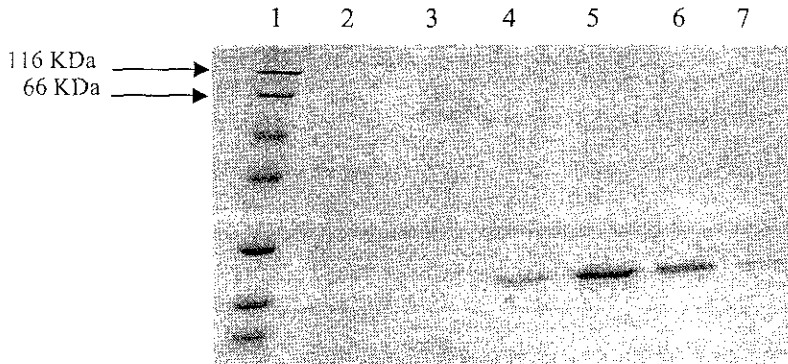
3.2.4.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการ purify โปรตีนด้วย Ni-column พบว่าแถบโปรตีนจากตัวอย่างทั้งสองตัวอย่างถูกชะออกมาหมดตั้งแต่ก่อนจะถึงขั้นตอนของการ elute ด้วย elution buffer (ชะออกมาใน flow through) นั้นแสดงว่าโปรตีนที่ได้มาจากการผลิตใน *E. coli* ไม่มีทรานสกลูตามินสโปรตีนที่ His-tag รวมอยู่ด้วยเพราะถ้ามีควรจะเห็น แถบโปรตีนในส่วนของ elution fraction (รูปที่ 8 เลนที่ 4, 5, 6, และ 7) ส่วนแถบที่พบในขั้นตอนการทำ SDS-Page ข้างต้นก็เป็นแถบของโปรตีนอื่นๆที่ *E. coli* น่าจะผลิตออกมา



รูปที่ 8 ผลการpurify sample protein ที่ได้จากที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามินสใน *E. coli* ด้วย Ni-column. 1; protein marker. 2; flow through. 3; wash fraction. 4; elution fraction 1. 5; elution fraction 2. 6; elution fraction 3. 7; elution fraction 4

ในส่วนของ control พบว่าสามารถ bind กับ Ni-column ได้ เพราะ control เองก็มี His tag ที่อยู่ติดกับส่วน thioredoxine ดังนั้นจึงเห็นแถบโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ thioredoxine เหมือนขั้นตอนการทำ SDS-Page ข้างต้น



รูปที่ 9. ผลการpurify control protein ด้วย Ni-column. 1; protein marker 2; flow through. 3; wash fraction 4; elution fraction 1 5; elution fraction 2 6; elution fraction 3 7; elution fraction 4

จากผลการทดลองในส่วนนี้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน *E. coli* ได้ จึงทำการเป็นระบบการผลิตโปรตีนโดยใช้ *P. pastoris* ซึ่งเป็น eukaryotic cell แทน

บทที่ 4

งานวิจัยส่วนที่ 3

การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลในยีสต์ *Pichia pastoris*

4.1 การโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลเข้าพลาสมิด pPICZ α B NH8 และการนำพลาสมิด pPICZ α B NH8 เข้าจีโนมยีสต์

4.1.1 วิธีการทดลอง

โคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลเข้าพลาสมิด pPICZ α B NH8 โดย amplify full length cDNA ที่อยู่ใน pGEM-T-easy (cloning vector) ด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*EcoRI*, *SacII*) จากนั้นตัดทั้งพลาสมิด pPICZ α B NH8 และ ยีนด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, และ *SacII* นำพลาสมิดและยีนที่ตัดแล้วมาทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase แล้วจึง transform เข้า *E.coli* strain Top 10 โดยทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่าย พลาสมิด บน LS-LB plate ที่มี zeocin ผสมอยู่ คัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายยีนไปหาลำดับเบสเพื่อเช็คว่าเกิดการเชื่อมต่อกันของยีนและ พลาสมิดในตำแหน่งที่ถูกต้อง และถูก reading frame โดยใช้ ไพรเมอร์ α factor และ 3' AOX ในการ sequence

เมื่อได้พลาสมิด pPICZ α B NH8 ที่มี ยีนทรานสกลูตามิเนสอยู่ จึงทำการตัดพลาสมิด pPICZ α B NH8 ด้วยเอนไซม์ *PmeI* (ซึ่งตรวจสอบแล้วว่าในยีนทรานสกลูตามิเนสไม่มีตำแหน่งจดจำของ *PmeI*) เพื่อ linearized พลาสมิดให้สามารถ integrate เข้า จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* จากนั้น transform เข้าจีโนมยีสต์ด้วยวิธี electroporation โดยทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่าย พลาสมิด บน YPD plate ที่มี zeocin ผสมอยู่ บ่มเพาะที่ 30 ° C เป็นเวลา 2-3 วัน

4.1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการ amplify full length cDNA ที่อยู่ใน pGEM-T-easy ด้วย ไพรเมอร์จำเพาะจะได้ PCR product ขึ้นขนาด 2.1 กิโลเบส หลังจากการตัดทั้งพลาสมิด pPICZ α B NH8 และ ยีนด้วย เอนไซม์ *EcoRI*, และ *SacII* นำพลาสมิดและยีนที่ตัดแล้วมาทำการเชื่อมต่อกัน แล้วจึง transform เข้า *E. coli* ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดโดยการทำ colony PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะเมื่อได้โคลนที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปจึงทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปหาลำดับเบส ผลการหาลำดับเบสพบว่ายีนทรานสกลูตามิเนสได้เชื่อมต่อนำเข้ากับ pPICZ α B NH8 ได้ถูก reading frame

ตัด pPICZ α B NH8 ที่มี ยีนทรานสกลูตามิเนสอยู่ เพื่อ linearized พลาสมิดให้สามารถ integrate เข้า จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* จากนั้น transform เข้าจีโนมยีสต์โดยทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด บน YPD plate ที่มี zeocin ผสมอยู่ บ่มเพาะที่ 30 ° C เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อทำ

การคัดเลือกโคลนที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดโดยการทำ colony PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าโคลน
 ที่ได้มีชั้นทรานสกลูตามีนอยู่จึงเก็บโคลนที่ได้ไว้เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์ทรานสกลูตามีนต่อไป

His -tag

GCA AAT AGG TTC TCT CGA AAA AGA GAG GCT GAA GCT GCA CAT CAC CAT
 CAC CAT CAT CAC CAT GCT GCA GTA CGT AGA ATT CCG AAC CAC AAA GGT
 TTG ATT AGT GAT GTG GAT CTC AGA AGT CGC GAG AAC AAC TCG GCA CAC
 CAC ACC AGG GAG ATC GAT CAA AAG CGT TTG ATT GTC CGT AGG GGT CAG
 CCC TTC TCC ATC ACT CTG CAG TGT AAT GGG TCT TTG CGC CCC AGA CAG
 CAC TTG GAT CTC GTC CTG CAC CTC GGT AAG AGA GAC GAG GTC GAG ATC
 AAG GTT CAG AAG GAG CGT GGA GCT GGG GAC AAG TGG TGG TTT AAC CAG
 CAG GGA GCA CAA GAT GAA ATG CTG CTG ACT CTG CAC AGT CCA GCT GAT
 GCT ATA ATT GCC CGG TAC AGT CTG GCT CTG CTG CTG ATC TCA CCG GAC
 GGA CGC ATT TTA GAG AAA AAG GAC AAA ATG AGT TTC CAC CTG CTC TAT
 AAC CCC TGG TGC AAA GAT GAT GTG GTG TAC CTG CCG GAC GAG ACC CAG
 CTT CAG CAG TAC ATC ATG AAC CAA GAC GGA ATA ATC TAC ATG GGG ACC
 TGG GAA TAC ATC AAA AGC ACT CAC TGG AAT TAT GGA CAG TTT GAC GAC
 TAT GTG ATG GAC ATC TGT TTT GAA GTC CTG AAT AAC TCC AAC GAT GCT
 CTG CGA AAC TCA CAG ATG GAC ATT GAG CAG ACA TTT GAC CCC GTC TAT
 GTC ACC AGG ATC ATC GCT GCA ATG GTG AAC TCT AAT GAT GAC AGA GGA
 GTG CTG ACT GGG CGC TGG ACT GAG CCG TAC TCT GAT GGA GTT CCA CCG
 TAC CAG TGG ACC GGC AGC GTA CCG ATC CTC CGT CAG TGG AGC AAA GCT
 GGG CTC AGA GCA GTG AAA TAT GGC CAG TGC TGG GTG TTT GCT GCT GTT
 GCA TGT ACA GTG CTG CGC TGT CTG GGA ATC CCA ACA CGC CTC ATC ACC
 AAC TTC TCC TCA GCT CAT GAT GTC GAT GCA AAC CCC TCT ATA GAC TTC
 CTG TTG GAT GAA AAC CTC CAA CCA TTG GAG AGC AGA GGA GGG AGA GAC
 AGC AGC TGG AAT TTC CAC TGC TGG GTG GAG TCT TGG ATG AGG AGA GAT
 GAT CTC CCC AAA GGA AAT GAT GGC TGG CAG GTT TTA GAT CCG ACC CCT
 CAA GAA CTC AGC AAT GGG GTT TTC CGC TGT GGT CCG TGC CCT GTG ACA
 GCC ATC AAG GAG GGA AAT CTG GGA GTG AAG TAC GAT GCT CCG TTT GTG
 TTT GCA GAG GTG AAC GCT GAC ATC ATC CAC TGG ATC GTT CAG AGA AAT
 GGC CAA CGG AGA AAA ATC AGA GTG GAC CAT GCC ACT GTG GGT AGC AAC
 ATC AGC ACC AAA AGT GTT TAT GGG GAC TTC AGA GAT GAT GTC ACT CTG
 CAC TAC AAA TAT CCT GAA GCA TCC AAC AAG GAG ACA GAA GTG TAC GAG
 AAG GCC GGG CGT CGG GTG ACA GAT GTC CCC AGT GAG AGC TCA GAA CCA
 GGA GGA CTG CAG CTG TCC ATC AAC CAT GCC AAG CCT GTG TTT GGG ACA
 CAC TTT GAT GTG ATT ATT GAG GTG AAG AAT GAA GGA GAC CAG GAT GCT
 CAT GTT CAG CTG ACC ATG CTG GCT ATG GCT GTT ACT TAC ACC TCT CTT
 CAT CGC GGG AAC TGC CAG AGG CAG ACC ACC ACT GTC ATG GTG CCT GCT
 CAC AAA GCT CAG CAC GAA GTG CTG CGT CTG CGC TAC GAT GAC TAT GCC
 CAG TGT GTC TCA GAC GAT CAT CTG ATC AGG GTG AAA GCA TTT GTA GAG
 CCT CCA GGC GAG AAC GAC CCC CTC CTG ACT GTG ACT GAC ATC CCA CTC
 AGC AGA CCT GAA GTC TTC ATA CAG GTT CCT GGC AGG GCT TTT GTT TGT
 GAA CAA GTA AAA GCT TCC ATC TCC TTC ACC AAT CCG TTA GCA GTT CCA
 CTG AAA GGA GGT GTG TTC ACT CTG GAG GGT GCA GGC CTA CTC TCT TCC
 ACT AAG ATC CAT GTT AGT GGG GAC ATT TCT CCA GGA CAG ACC GTG TCC
 ATT GTG GTG TCC TTC TCA CCC ATG AGG ACT GGG GTG AGG AAG CTG CTG
 GTG GAC TTT GAC TCT GAC CGA CTG AAA GAT GTA AAG GGA GTC ACC ACT
 GTG GTC GTC CGC AAG AAG TAC AGA AAT ATC TTC CCT GAA ATT ACT GAA
 TGT TAT CCC GCG GCG GCC GCC AGC TTT CTA GAA CAA AAA CTC ATC

His -tag

TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT
TGA GTT TGTA

รูปที่ 10 ผลการ sequence เพื่อหา ลำดับเบสของยีนทรานสกลูตามิเนสใน pPICZαB NH8 พลาสมิด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมคือลำดับเบสของทรานสกลูตามิเนส

4.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสในยีสต์ *P. pastoris* ในระดับ shake flask

4.2.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสในระดับ shake flask

4.2.1.1 วิธีการทดลอง

นำโคลนที่ได้มาเลี้ยงใน 100 ml. BMGY medium ซึ่งมี กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 2 วัน ก่อนจะทำการ induce ด้วย 0.1 % เมทานอล เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ยีสต์ทำการผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C, 200 rpm

4.2.1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการเลี้ยงยีสต์ 2 โคลนเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์และมีการเลี้ยง control ซึ่งเป็นยีสต์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดเปล่าที่ไม่มีการตัดต่อจีนยีนเข้าไปเพื่อเป็นตัวควบคุมด้วย โดยเลี้ยงในอาหาร BMGY ก่อนจะ induce ด้วย เมทานอล ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ในวันสุดท้ายปั่นเซลล์แยกจากส่วนใส ก่อนนำส่วนใสที่ได้ผ่าน ultrafiltration เพื่อ concentrate โปรตีนที่ได้ โดยได้ทำการ concentrate โปรตีน 50 เท่า แล้วจึงนำ concentrate โปรตีน ไปวิเคราะห์ต่อไป

4.2.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

4.2.2.1 วิธีการทดลอง

ใน reaction ที่จะใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ประกอบด้วย monodansylcadaverine, N-N' dimethylcasein, DTT, Tris-HCl pH 7.5, CaCl₂, บ่ม reaction ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ที่ต้องการวัด (ส่วนใสที่ถูกปั่นแยกออกจากเซลล์) 100 µl ก่อนนำไปบ่มที่ 37 °C, 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย EDTA ก่อนนำไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ จะใช้หลักการ incorporation ของ fluorescence amine (monodansylcadaverine) กับ N, N' dimethylcasein โดยจะวัดการเพิ่มขึ้นของ fluorescence โดยใช้ fluorescence spectrophotometer ที่ excitation wave length 350 nm และ emission wave length 480 nm

4.2.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าทรานสกลูตามิเนสที่ผลิตได้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเทียบกับ control คือทั้งในตัวอย่างและ control ให้ผลไม่ต่างกันจึงทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

4.2.3 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

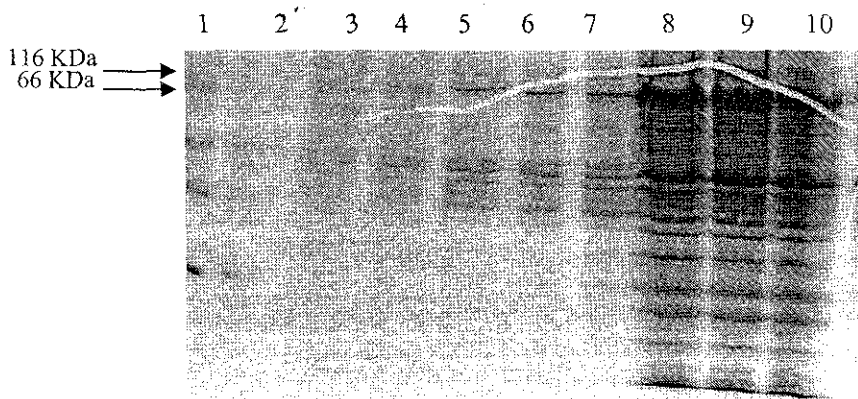
4.2.3.1 วิธีการทดลอง

นำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm, 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ° C ส่วนของ supernatant นำไป concentrate 50 เท่า ส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้แช่ที่ -70 ° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม breaking buffer เพื่อละลายเอาตะกอนเซลล์ขึ้นมา จากนั้นเติม glass bead แล้วนำไป vortex 20 นาที เพื่อให้เซลล์แตก แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลว (Soluble) ออกจากตะกอนเซลล์ (Insoluble)

นำตัวอย่าง concentrated supernatant, Soluble และ Insoluble มาเติม dye + mercaptoethanol ก่อนนำไปต้มที่ 100 ° C , 10 นาที แล้วจึงโหลดบน 15 % SDS-PAGE ที่เตรียมไว้ โดยรันที่ 120 โวลต์ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาย้อมด้วย coomassie blue ค้างคืน และ ถ้างสีย้อมเป็นเวลา 30 min

4.2.3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 87.9 KDa ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลที่ได้จากการคำนวณ



รูปที่ 11. ผลการทำ SDS -PAGE. ของคโปรตีนที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน *P. pastoris* 1; protein marker. 2; โคลน1 supernatant 3; โคลน2 supernatant. 4; control supernatant. 5; โคลน1 soluble. 6; โคลน2 soluble. 7; control soluble. 8; โคลน1 insoluble. 9; โคลน2 insoluble 10; control insoluble.

จากผลดังกล่าวจึงทำการตรวจหาการสร้างทรานสคริปตามีนสในระดับ RNA เพื่อพิสูจน์ว่าปัญหาเกิดจากการ transcription หรือไม่

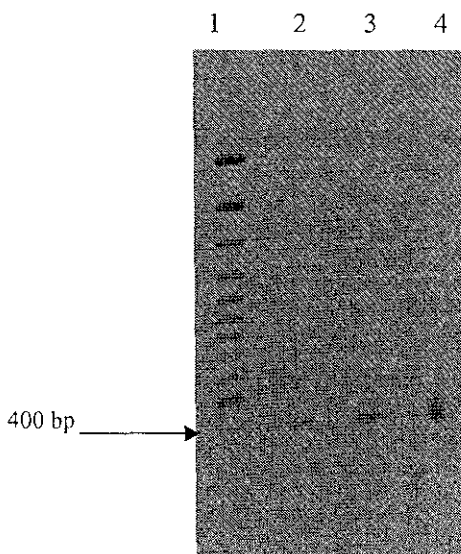
4.2.4 การตรวจหาการสร้างทรานสคริปตามีนสในระดับ RNA

4.2.4.1 วิธีการทดลอง

สกัด RNA จากเซลล์ที่ปั่นแยกเก็บไว้โดยใช้ TRIZOL จากนั้นสังเคราะห์สาย cDNA โดยการทำให้ RT-PCR แบบ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ total RNA เป็นแม่แบบ ด้วยไพรเมอร์ที่มีเป็น poly T จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดย PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ โดยถ้ามีการแสดงออกของเอนไซม์ทรานสคริปตามีนสในระดับ RNA ขึ้นยีน PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์

4.2.4.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังจากที่สกัด RNA มาทำ RT-PCR พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาด 400 เบส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการที่ไม่สามารถผลิตโปรตีนได้ ไม่ได้มีผลมาจากการ transcription จึงทำให้มีการสร้างทรานสคริปตามีนสในระดับ RNA ได้



รูปที่ 12. ผล gel electrophoresis ในการตรวจสอบการสร้างทรานสคริปตามีนสในระดับ RNA

1; 100 bp DNA marker. 2; clone1. 3; clone2. 4; positive control

จากผลที่ได้จึงสันนิษฐานว่าการที่ไม่พบการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามินเอสในระดับ shake flask อาจมาจากการผลิตโปรตีนในระดับที่น้อยไป โปรตีนที่ได้จึงไม่มากพอให้ตรวจพบได้ จึงทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามินเอสในยีสต์ *P. pastoris* ในระดับถังหมัก เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้มากพอที่จะตรวจสอบได้ เนื่องจากมั่นใจว่าโคลนที่ได้คัดเลือกมามีการผลิต mRNA ได้ จึงคาดว่าควรจะผลิตโปรตีนทรานสกลูตามินเอสได้

4.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามินเอสในยีสต์ *P. pastoris* ในระดับถังหมัก

4.3.1 การเตรียมถังหมัก และการผลิตทรานสกลูตามินเอสในถังหมัก

4.3.1.1 วิธีการทดลอง

เตรียมกล้าเชื้อลงถังหมัก โดยการเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Y11430 ที่มียีนทรานสกลูตามินเอสแทรกอยู่ในจีโนมจากอาหารวุ้นลงในอาหารเหลว BMGY ปริมาตร 70 ml. ใน flask ขนาด 250 ml. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C , 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะถ่ายเชื้อลงถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหาร glycerol basal salt ในการหมักนี้ อุณหภูมิ pH, DOT , อัตราการให้อากาศ, ความดัน, อัตราการกวนและการควบคุมการเกิดฟองจะใช้ระบบควบคุมอัตโนมัติ

4.3.1.2 ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้กระบวนการหมักจะแบ่งเป็น 4 ช่วง (ตาม Charoenrat, et.al, 2005 และ รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris*)

1. Glycerol batch phase: เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการหมักแบบ batch โดยจะสิ้นสุดกระบวนการเมื่อยีสต์ใช้ glycerol จนหมด โดยกระบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง
2. Glycerol fed-batch phase: เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการหมักแบบเติมสารอาหาร โดยช่วงนี้จะมีการเติม glycerol 500 กรัมต่อลิตรที่มี 12 มิลลิตร/ลิตรของ PTM1 trace salt ผสมอยู่ กระบวนการนี้ใช้เวลา 3.5 ชั่วโมง
3. Methanol induction phase: เป็นการกระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีนโดยการหมักแบบเติมสารอาหาร โดยจะเติม 99.5 % methanol ที่มี PTM1 trace salt ผสมอยู่ เข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการเติมที่ต่ำมาก เพื่อให้ยีสต์มีการปรับตัวที่จะใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน กระบวนการในช่วงนี้ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง
4. Methanol production phase: เป็นกระบวนการควบคุมการผลิตโปรตีนแบบเติมสารอาหาร โดยจะเติม 99.5 % methanol ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิตร / ลิตรผสมอยู่โดยควบคุม อัตราการกวน 1,000 rpm , pH 5.5 และ อุณหภูมิ 20 °C กระบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ 4 วัน ก่อนทำการเก็บเซลล์

จากนั้นทำการเก็บแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำหมักไปทำการตรวจสอบต่อไป

4.3.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

4.2.2.1 วิธีการทดลอง

ใน reaction ที่จะใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ใช้หลักการและ solution ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

4.2.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าทรานสกลูตามิเนสที่ผลิตได้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเทียบกับ control จึงทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE ต่อไป

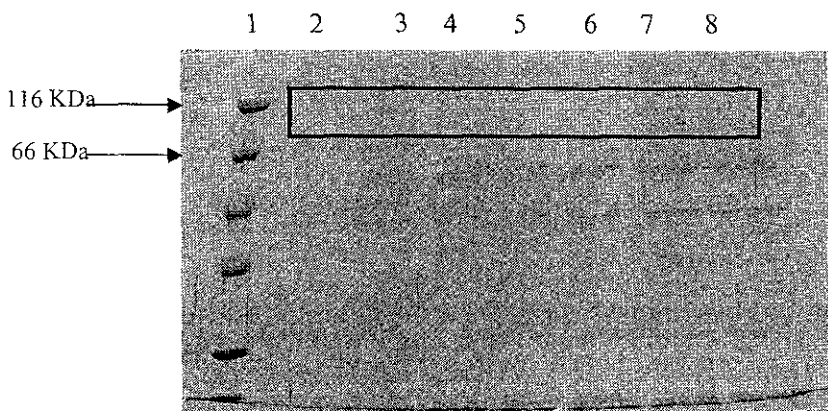
4.3.3 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

4.3.3.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ถูกปั่นแยกจากเซลล์มาเติม dye + mercaptoethanol ก่อนนำไปต้มที่ 100 ° C , 10 นาที แล้วจึงโหลดบน 15 % SDS-PAGE ที่เตรียมไว้ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาย้อม ด้วย coomassie blue ค้างคืน และ ล้างสีย้อม 30 min

4.3.3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 87.9 KDa โดยเห็นเป็นแถบบางๆ ซึ่งแถบจะปรากฏในช่วงของ induction phase จึงคาดว่าแถบที่ได้อาจเป็นแถบทรานสกลูตามิเนสโปรตีน



รูปที่ 13. ผลการทำ SDS –PAGE ของโปรตีนที่ได้จากการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน

P. pastoris ในระดับถังหมัก. 1; protein marker. 2; Gly batch. 3; Gly fed-batch. 4; induction phase day1. 5; induction phase day2. 6; induction phase day3. 7; induction phase day4. 8; induction phase day 5.

เพื่อพิสูจน์ว่ามีการผลิตทรานสกลูตามิเนสโปรตีนจริงจึงทำการวิเคราะห์โดยการทำ Western blot โดยใช้ His antibody เป็น probe

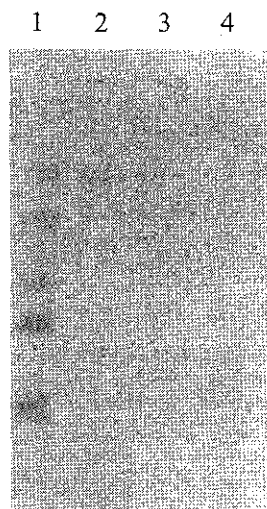
4.3.4 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot

4.3.4.1 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำ SDS-PAGE โดย โปรตีนถูกแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 20 นาที ก่อนทำการ transfer โปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน โดยใช้กระแสไฟ 60 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเมมเบรนที่มีโปรตีนอยู่ ไป incubate ด้วย blocking buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย TBST 10 นาที 2 ครั้ง แล้วจึง incubate เมมเบรนด้วย His probe HRP- TBST working solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBST 10 นาที 4 ครั้ง ก่อนจะ incubate เมมเบรนด้วย Super signal working solution (substrate) 3-5 นาที

4.3.4.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการทดลองนี้มี positive control คือ pfu protein ที่มี His tag เชื่อมอยู่กับโปรตีน ผลการทดลองพบว่าในตัวอย่างพบแถบแต่มี smear แถบซึ่งคาดว่าไม่น่าจะเกิดจากการจับกันของ His ในทรานสกลูตามิเนสโปรตีน กับ His antibody โดยได้ทำการทดลองซ้ำหลายครั้งแต่ผลที่ออกมาก็ไม่ต่างกัน



รูปที่ 14. ผลการทำ Western blot. 1; protein marker. 2; pfu . 3; sample. 4; control

จากการทดลองในส่วนที่ 3 นี้จึงไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจาก ปลายินดีในยีสต์ได้ โดยยังไม่สามารถหาสาเหตุที่แน่ชัด เนื่องจากสามารถตรวจพบ mRNA ของทรานสกลูตามิเนสได้ แต่ไม่สามารถตรวจหาโปรตีนได้

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยส่วนที่ 1 สามารถโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลได้ โดยยีนส่วนที่ถูกแปลรหัสมีขนาด 2,091 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 696 ตัว จากลำดับของกรดอะมิโนพบว่า มีความเหมือนกับทรานสกลูตามิเนสจาก ปลาดุกแดงสูงสุด อยู่ 78% และน้ำหนักโมเลกุลของทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลที่ได้จากการคำนวณคือ 78.9 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.31

จากงานวิจัยส่วนที่ 2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน *E. coli* พบว่าไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลใน *E. coli* ได้จึงทำการเป็นระบบการผลิตโปรตีน โดยใช้ ยีสต์เป็น expression host แทน

จากงานวิจัยส่วนที่ 3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลในยีสต์ *P. pastoris* พบว่าไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลในยีสต์ แม้ว่าจากการตรวจสอบแล้วพบว่ามีการสร้าง mRNA ก็ตาม

ดังนั้นสิ่งที่ปัญหาต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสน่าจะเกิดจากกระบวนการ translation ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาค้นคว้าต่อไปเพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน host ที่เหมาะสมได้

บรรณานุกรม

สุทรวัดน์ เบญจกุล บทบาทของเอนไซม์ในซูริมิ: ซูวาริ. วารสารอาหาร Food ปีที่ 28, ฉบับที่.1, มกราคม-มีนาคม 2541. หน้า. 5

Aeschlimann, D. and Paulsson, M. (1994) Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissue and body fluids. Thromb Haemost, 71, 402-415.

Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H. and Schieberle, P. (2003). Studies on effects of MTGase on Gluten Protein of wheat. Cereal Chemistry. 80: 781-786

Charoenrat, T., Ketudat-Cairns M., Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors, S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering, 27: 339-406

De Backer-Royer, C., Meunier, JC. 1992. Effect of temperature and pH on factor XIIIa from human placenta. J BioChem 24:637-642.

Folk, J. E. (1980). Transglutaminases. Annu. Rev. Biochem., 49: 517-531

Kampong, O. and Ketudat-Carins, M. Cloning of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Transglutaminase cDNA (Oral presentation) The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok Thailand

Kang, H. and Cho, Y.D. (1996). Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun. 223: 288-292.

Kennedy, B. O. (1999). Use of Novel Dairy Ingredients in Processed Meats. Dairy products research centre. DPRC no. 15. Moorepark, Fermoy, Co.Cork, Ireland

Kumazawa Y., Seguro M., Yasueda H., Sano, K., and Motoki, M. (1997). Purification and charac-

- terrization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45(3): 604–606.
- Kurth, L. and Rogers, P.J. (1984). Transglutaminase catalysed cross-linking of myosin to soy protein casein and gluten. Journal of Food Science, 49, 573–576, 589.
- Loonchanta, A. and Ketudat-Cairns (2003) Primer Design for Amplification of Transglutaminase Gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Poster presentation BioThailand 2003 Technology for life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Lorenzen, P. C., Neve, H. , Mautner, A. and Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. International Journal of Dairy Technology. 55: 152-157
- Sakamoto, H. (1996). Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during chinese noodle processing' in Nippon Shokuhin. Kagaku Kaishi. 43: 598-602
- Motoki, M. and Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. Trends in Food Science & Technology. 9: 204-210
- Nonaka, M., H. Tanaka, A. Okiyama, M. Motoki, H. Ando, K. Umeda, and M. Matura. 1996. Polymerisation of several proteins by Ca²⁺- independent transglutaminase derived from microorganism. Agric. Biol. Chem. 53:2619–2623
- Worratao, A. (2005). Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). M.S. thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Yasuda, H., Nakanishi, K., Kumazawa, Y., Nagase, K., Motoki, M. and Mastsui, H. (1995). Tissue type TGase from red sea bream (*Pagrus major*). sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry. 232: 411-419

Zhu, Y. , Rinzena, A. and Tramper, J. (1995). Microbial transglutaminase a review of its Production and application in food processing. Journal of Biology Apply microbial biotechnology. 44: 277-282

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

โปสเตอร์เสนอผลงาน การประชุม

BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

Primer Design for Amplification of Transglutaminase Gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Anantasak Loonchanta and Mariena Ketudat-Cairns

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand anantasak@hotmail.com, ketudat@ccs.sut.ac.th

Abstract

Transglutaminase enzyme (TGase; protein-glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) catalyses an acyl-transfer reaction between the γ -carboxamide group of peptide-bound glutamine residues (acyl donors) and variety of primary amines (acyl acceptors), including the ϵ -amino group of residues in certain proteins with the subsequent results in amine incorporation, crosslinking and deamidation. Six amino acid sequences of TGase from five organisms, which are *Pagrus major* (red sea bream), *Oncorhynchus keta* (chum salmon), *Danio rerio* (zebrafish), *Cyprinus carpio* (common carp) and two from *Gallus gallus* (chicken) were aligned by CLUSTALW program. The conserved regions were used to design four degenerate primers for *Oreochromis niloticus* transglutaminase cDNA amplification. The use of 3TGase_f and 2TGase_r primer pairs results in 1200 bp PCR product. The 1TGase_f and 4TGase_r primer pairs results in 840 bp PCR product, and 770 bp PCR product is from 1TGase_f and 2TGase_r primer pairs. All of the products were larger than the expected size from the CLUSTALW alignment. The PCR products were cloned and sequenced. The total combined sequence was then analyzed by BLASTx program and the results showed similarity to TGase gene but contain a substantial number of extra bases. These extra bases were thought to be introns. The sequence was further used to design primer for 5' and 3' RACE.

Introduction

Transglutaminase enzyme (TGase; protein-glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) are a family of enzymes that catalyze the posttranslational modification of proteins by inserting an isopeptide bond within or between the polypeptide chains. The reaction results from a Ca^{2+} -dependent exchange of primary amines for ammonia at the γ -carboxamide group of glutamine residues. Peptide-bound lysine or polyamines serve as the primary amines in the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine or (γ -glutamyl)polyamine bonds [1]. TGase can modify proteins by means of amine incorporation, crosslinking and deamidation. TGase is widely used in food processing via its catalytic ability such as gelation which is very useful in protein texturization. It is applicable in meat product such as restructured meat, fish product such surimi which is widely used as functional ingredient in seafood analogs, dairy product for example yogurt, soybean product such as tofu and yuba, and also wheat product such noodles and pasta [2].

We are interested to obtain the enzyme by means of genetic manipulation using host microorganisms or production of recombinant protein. From Worratao and Yongsawasdekul's work, Nile tilapia muscle has been found to contain high activity of TGase. Thus, we would like to obtain TGase gene from Nile tilapia muscle and produce recombinant TGase by host organisms. In order to get the full-length sequence of TGase, it is necessary to get the first small cDNA sequence. Consequently, the objective of this study is to design primer and amplify partial cDNA of transglutaminase gene.

17-20 July 2003 PEACH, Pataya, Thailand

Results

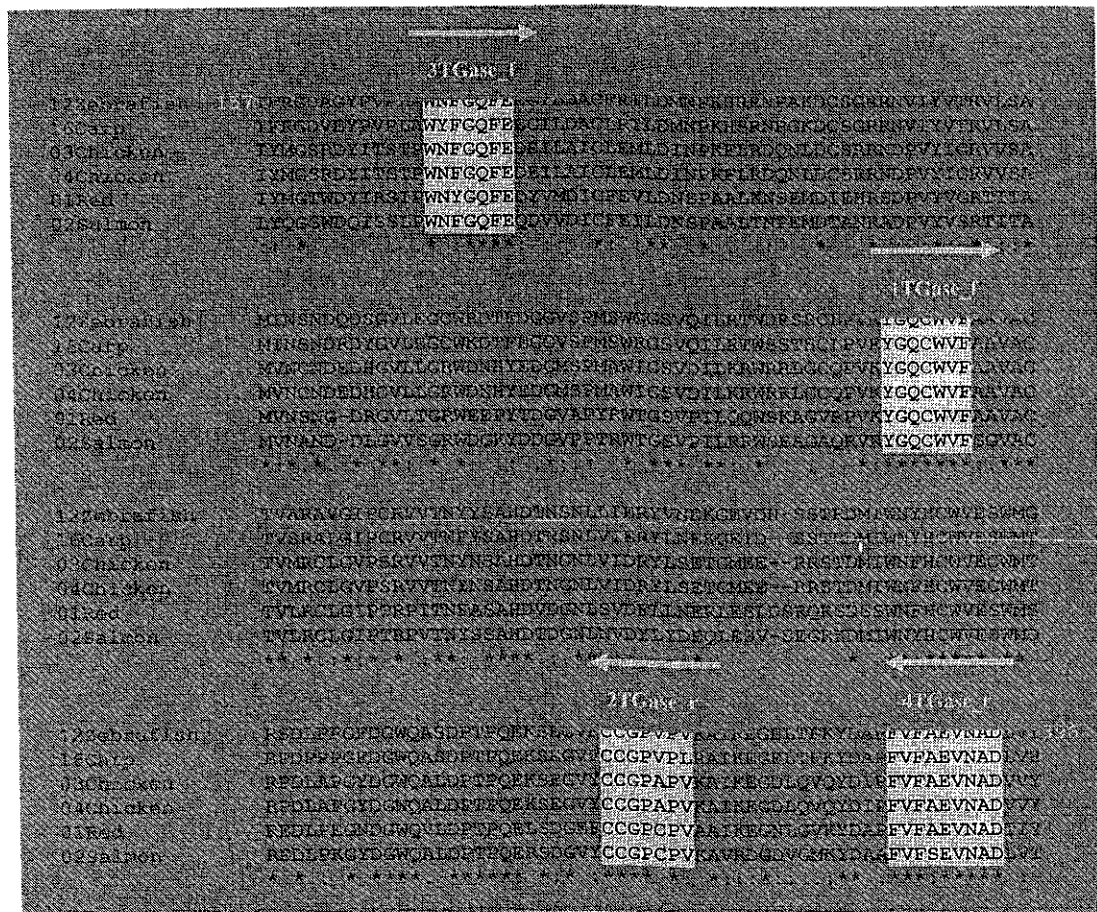


Figure 1 Result of alignment by CLUSTALW of six amino acid sequences from five organisms which are *Pagrus major* (red sea bream), *Oncorhynchus keta* (chum salmon), *Danio rerio* (zebrafish), *Cyprinus carpio* (common carp) and two from *Gallus gallus* (chicken). Four conserved regions were used to design four degenerated primers (1TGase_f, 2TGase_r, 3TGase_f and 4TGase_r) to amplify partial cDNA sequence of transglutaminase (TGase) gene from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* muscle.

Table 1 Four degenerated primers designed from four conserved regions (figure 1) used to amplify partial cDNA sequence of TGase gene from Nile tilapia muscle.

Primer Name	Conserved Protein Sequence	Nucleotide Sequence
1TGase_f	YGQCWVF	5'-TA(T/C)GGCA(A/G)TG(T/C)TGGGTTT-3'
2TGase_r	TCGRCPV	5'-ACGGC(A/G)CAGGCG(A/G)CA(A/G)GCG-3'
3TGase_f	YVNSVTE	5'-TTCAGTTTCTGGTCTATTTTCT-3'
4TGase_r	EVFAEVD	5'-TTCGCAATGAGCTCTGTCAGTCTTGGTGA-3'

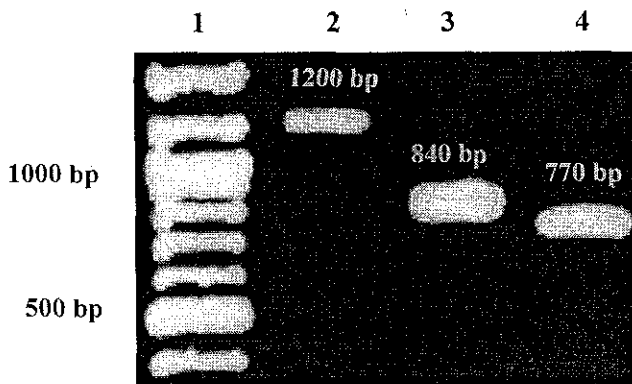


Figure 2 PCR product resulted from the sets of degenerate primers in amplification of partial cDNA sequence of TGase gene:

- Lane 1: 100 bp marker,
- Lane 2: 3TGase_f & 2TGase_r,
- Lane 3: 1TGase_f & 4TGase_r,
- Lane 4: 1TGase_f & 2TGase_r.

Table 2 Comparison of expected and experimental size of PCR product from amplification of partial cDNA of TGase gene by different primer pairs.

Primer Pairs	Expected size, bp (amino acids)	Experimental size, bp (from sequencing results)
3TGase_f & 2TGase_r	600 (200)	1189
1TGase_f & 4TGase_r	387 (129)	839
1TGase_f & 2TGase_r	315 (105)	765

17-20 July 2003 PEACH, Pataya, Thailand

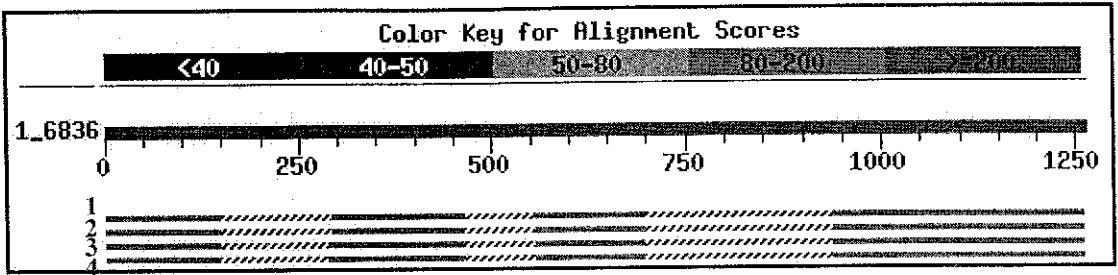


Figure 3 Result of BLASTx of the total combined cDNA sequence (1,263 bp). The sequence from Nile tilapia showed similarity to TGase gene from other organisms but contain a substantial number of extra bases. These extra bases were thought to be intron. Sequences 1, 2, 3, and 4 are chicken TGase2, Chicken, xenopus, and Human TGase, respectively.

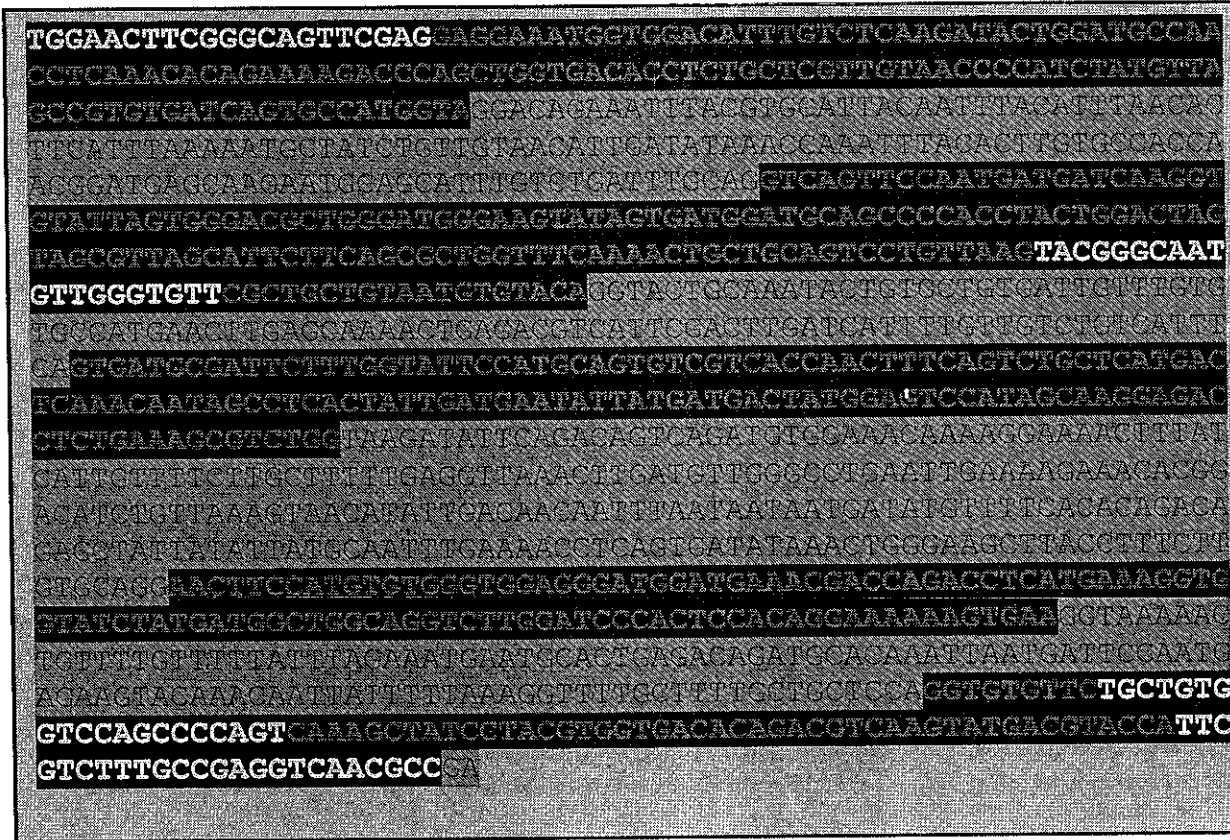


Figure 4 The introns (grey highlights) and exon (black highlights) regions resulted from the comparison of the cDNA sequence from Nile tilapia and other organisms by BLASTx. Blue highlights show the position of four primers used.

17-20 July 2003 PEACH, Pataya, Thailand

Discussion and Conclusion

In the reverse transcription reaction to obtain the cDNA, total RNA and primer 4TGase_r were used as the template and primer to synthesized the first stranded cDNA, not the poly A RNA nor the oligo dT primer. The RNA template might have been the primary transcript prior to the splicing of the introns. Therefore, the experimental size of the amplified product (figure 2) were larger than the expected size (table 2).

From the BLASTx alignment (figure 3), there were three regions that do not match with the TGase sequence. When the tilapia TGase sequence was spliced manually *in silico*, the alignment show 61% identity match with the chicken TGase (figure 5).

In conclusion, the four primers design from CLUSTALW alignment were able to amplify partial TGase cDNA from Tilapia muscle.

Future Work

This partial cDNA sequence will be use to design primers for 3' and 5' RACE to obtain the full-length TGase cDNA from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* muscle for further study and production of the recombinant TGase enzyme.

References

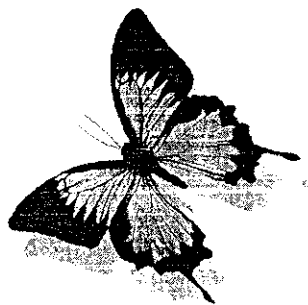
1. Chen, S.K.J., and Mehta, K. (1999) Tissue transglutaminase: an enzyme with split personality. *J. Biochem. and Cell Bio.* 31, 817-836
2. Motoki, M and Seguro, K (1998) transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Sci. &Tech.* 9, 204-210
3. Worratao, A and Yongsawatdigul, J. (2002). Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. *J. Food Biochem.* In press.

ภาคผนวก ข

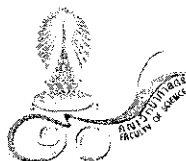
บทคัดย่อ (Oral presentation) งานประชุมวิชาการ

The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok Thailand

PROGRAM and ABSTRACTS



The Eleventh Biological Sciences Graduate Congress



Hosted by:

*Faculty of Science,
Chulalongkorn University, THAILAND*



In Collaboration with:

*Department of Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE*



*Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA*



Cloning of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Transglutaminase cDNA

Kampong, O.¹ and Ketudat - Cairns, M.²

¹Department of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand.

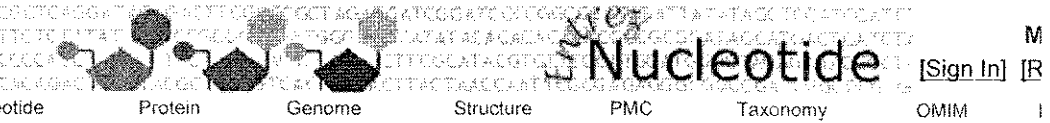
E-mail: Ormruthai@hotmail.com

²Department of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000. Thailand.

The cDNA encoding transglutaminase from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver was cloned and sequence. The cDNA sequence consists of 2,493 or 2,594 nucleotides depend on the 3' UTR. The cDNA encodes an open reading frame of 2,091 nucleotides coding for 696 amino acids. The amino acid sequence of Nile Tilapia liver TGase showed 78 %, 59 %, 59 % and 41 % identity with TGase from red sea bream, chum salmon, zebra fish and chicken, respectively. The catalytic triad of Nile Tilapia TGase consists of Cys 272, His 332 and Asp 355 similar to the red sea bream TGase. The putative active site Cys 272 of the enzyme was complete conserved between the two species. The Nile Tilapia TGase had an extension of 1 amino acid at the C-terminal region and some differences in the N-terminal region when compared with red sea bream TGase. The calculated molecular weight of Nile Tilapia TGase is 78.9 kDa with an isoelectric point of 6.31.

ภาคผนวก ก

Submission ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสคริปต์ตามิเนสจากปลาในฐานข้อมูล NCBI

Search Nucleotide for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mF

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features:

1: [DQ480532](#). Reports *Oreochromis nilot...*[gi:94421333] [Links](#)

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS DQ480532 2091 bp mRNA linear VRT 03-MAY-2006

DEFINITION *Oreochromis niloticus* transglutaminase mRNA, complete cds.

ACCESSION DQ480532

VERSION DQ480532.1 GI:94421333

KEYWORDS .

SOURCE *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)

ORGANISM *Oreochromis niloticus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Labroidei; Cichlidae; African cichlids; Pseudocrenilabrinae;
 Tilapiini; *Oreochromis*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2091)

AUTHORS Kampong,O. and Ketudat-Cairns,M.

TITLE Sequence analysis of the cDNA of tissue-type transglutaminase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2091)

AUTHORS Kampong,O. and Ketudat-Cairns,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-APR-2006) Biotechnology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2091

/organism="Oreochromis niloticus"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:8128"

CDS 1..2091

/note="protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase"

/codon_start=1

/product="transglutaminase"

/protein_id="ABF18835.1"

/db_xref="GI:94421334"

/translation="MANHKGLISDVDLRSRENNSAHHTREIDQKRLIVRRGQPFSITL
 QCNGSLRPRHHLDLVLHLGKRDEVEIKVQKERGAGDKWVFNQQAQDEMLLTLHSPAD
 AIIIGRYSLAVLLMSPDGRILEKKDKMSFHLLYNPWCKDDVVYLPDETQLQEYIMNEDG
 I IYMGTW EYIKSTHWNYGQFEDYVMDICFEVLNNSNDALRNSQMDIEQRFDPVYVSRI
 IAAMVNSNDDRGVLTGRWTEPYSDGVAPYQWTGSVPILRQWSKAGVRAVKYGQCWVFA
 AVACTVLRCLGIPTRLITNFSSAHDVDGNPSIDFLLDENLQPLESRGGRDSSWNFHCW
 VESWMMRRDDLPGKNDGWQVLDPTPQELSNVGFRCGPCPVTAIKEGNLGVKYDAPFVFA
 EVNADIIHWIVQRNGQRRKI RVDHATVGRNISTKSVYGDVDFRDDVTLHYKYPEGSKKER
 EYVEKAGRRVTDVPSSESEPGRLQLSIKHAKPVFGTDFDVI IEVKNEGDQDAHVQLTM
 LAMAVTYSSLHRGNCQRQT TTVMVPAHKAQQEVLRLRYDDYAQCVSDDHLIRVKAFVE
 APGENEPLLTVDIPLSRPEVFIQVPGRAFVCEQVKASISFTNPLPVPLKGGVFTLEG
 AGLLSSTKIHVSGDISPGQTVSIVVSFSPMRTGVRKLLVDFDSDRLKDVKGVTTVVVR
 KKYRNI FPEITECY"

ORIGIN

```
1 atggccaacc acaaaggttt gattagtgat gtggatctca gaagtgcgga gaacaactcg
61 gcacaccaca ccagggagat cgatcaaaaag cgtttgattg tccgtagggg tcagcccttc
121 tccatcactc tgcagtgtaa tggctctttg cgcccagac accacttgga tctggctctg
181 cacctcggta agagagacga ggtggagatc aagggtcaga aggagcgtgg agctggggac
241 aagtgggtgt ttaaccagca gggagcacia gatgaaatgc tgctgactct gcacagtcca
301 gctgatgcta taattggccg gtacagtctg gctgtgctgc tgatgtcacc ggacggacgc
361 attttagaga aaaaggacaa aatgagtttc cacctgctct ataaccctcg gtgcaaagat
421 gatgtgggtg acctgcccg aagagcgcag cttcaggagt acatcatgaa cgaagacgga
481 ataatctaca tggggacctg ggaatacatc aaaagcactc actggaatta tggacagttt
541 gaggactatg tgatggacat ctgttttgaa gtccctgaata actccaacga tgctctgcca
601 aactcacaga tggacattga gcagagattt gaccccgtct atgtcagcag gatcatcgct
661 gcaatggtga actctaatga tgacagagga gtgctgactg ggcgctggac tgagcctgac
721 tctgatggag ttgcaccgta ccagtgacc ggcagcgtac cgatcctccg tcagtggagc
781 aaagctgggg tcagagcagt gaaatatggc cagtgcctgg tgtttgctgc tgttgcatgt
841 acagtgctgc gctgtctggg aatcccaaca cgctcatca ccaacttctc ctgactcat
901 gatgtcgatg gaaaccctc tatagacttc ctgttggatg aaaacctgca accattggag
961 agcagaggag ggagagacag cagctggaat ttccactgct ggggtggagtc ttggatgagg
1021 agagatgatc tccccaaagg aatgatggc tggcaggttt tagatcccac cctcaagaa
1081 ctgagcaatg gggttttccg ctgtggtccg tgccctgtga cagccatcaa ggagggaaat
1141 ctgggagtga agtacgatgc tccgtttgtg tttgcagagg tgaacgctga catcatccac
1201 tggatcgctc agagaaatgg ccaacggaga aaaatcagag tggaccatgc cactgtgggt
1261 aggaacatca gcacaaaag tgtttatggg gacttcagag atgatgtcac tctgcactac
1321 aatatcctg aaggatccaa gaaggagaga gaagtgtacg agaaggcggg gcgtcgggtg
1381 acagatgtcc ccagtggag ctcagaacca ggacgactgc agctgtccat caagcatgcc
1441 aagcctgtgt ttgggacaga ctttgatgtg attattgagg tgaagaatga aggagaccag
1501 gatgctcatg ttcagctgac catgctggct atggctgtta cttacagctc tcttcacgg
1561 gggaaactgcc agaggcagac caccactgtg atggtgctg ctcaaaagc tcagcaggaa
1621 gtgctgcgctc tgcgctacga tgactatgcc cagtgtgtct cagacgatca tctgatcagg
1681 gtgaaagcat ttgtagaggc tccaggcag aacgagcccc tcctgactgt gactgacatc
1741 cactcagca gacctgaagt cttcatacag gttcctggga gggcttttgt ttgtgaacaa
1801 gtaaaagctt ccatctcctt caccaatccg ttaccagttc cactgaaagg aggtgtgttc
1861 actctggagg gtgcaggcct actctcttcc actaagatcc atgttagtgg ggacatttct
1921 ccaggacaga cgggtgcat tgtggtgtec ttctcaccba tgaggactgg ggtgaggaag
1981 ctgctgggtg actttgactc tgaccgactg aaagatgtaa agggagtac cactgtggtc
2041 gtccgcaaga agtacagaaa tatcttccct gaaattactg aatgttatta a
```

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
NCBI | NLM | NIH

Feb 20 2007 16:53:14

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการ

- ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 01120 08 7
รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
e-mail: ketudat@sut.ac.th
- ประวัติการศึกษา
 - พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology)
University of California, San Diego, USA
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 - Molecular Biology
 - Genetic Engineering
 - Recombinant Protein Production
 - Bioinformatics
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำ
การวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย
เป็นต้น
 - ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี,
ผู้ประสานงานชุดโครงการวิจัยโปรตีน, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
 - หัวหน้าโครงการวิจัย : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้
 - Production of Tilapia Transglutaminase รายงานฉบับนี้
 - Expression and Production of β -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*
 - Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase

- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl

7.3 ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses แล้วเสร็จ 2545
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. (National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2 (NIH, USA), แล้วเสร็จ 2537
- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase, แล้วเสร็จ 2541
- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe, แล้วเสร็จ 2543
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, แล้วเสร็จ 2545
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm, แล้วเสร็จ 2546
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, แล้วเสร็จ 2547
- Expression and Production of β -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, แล้วเสร็จ 2548
- The Study for Optimum Production Conditions of Recombinant Proteins in Bioreactor, แล้วเสร็จ 2549

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :

- Search for new Glycosyl hydrolases and theirs expression in KDML Rice
สถานภาพในการทำวิจัย :
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 40%
- Development of biological probes to assure traceability of tilapia from the North East of Thailand
สถานภาพในการทำวิจัย :
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 15%
- Enterokinase cloning and production
สถานภาพในการทำวิจัย :
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2549 และได้ดำเนินการไปแล้ว 90%
- Production of Tilapia Transglutaminase รายงานฉบับนี้

ประวัติผู้ร่วมวิจัยที่ 1

1. ชื่อ (ภาษาไทย) น.ส. อ้อมฤทัย คำผง

(ภาษาอังกฤษ) Miss Ormruthai Kampong

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 5801 00034 72 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่มีติดต่อกับได้

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150

e-mail: ormruthai@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2548 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular biology

- Recombinant DNA technology

- Recombinant protein production

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำงานวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: -

7.3 ผู้ร่วมวิจัย: ในโครงการวิจัย

- Cloning and production of recombinant Transglutaminase from Nile Tilapia

รายงานฉบับนี้

7.4 รายงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Cloning and production of recombinant Transglutaminase from Nile Tilapia

รายงานฉบับนี้