



รายงานการวิจัย

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ไคตินเนสที่สกัดจากเชื้อ *Vibrio carchariae* แต่แสดงออกใน *E. coli*: การนำผลิตผลจากการย่อยสลายไคตินโดย
ขบวนการชีวภาพมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

(Functional and Structural Characterisation of *V. carchariae* expressed in
an *E. coli* System: Medical Application from Bioconversion of Chitin)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546-2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2550

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รศ. ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้อธิบายเกี่ยวกับการโคลนยีนโคติเนส เอ ของแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* ขนาด 1.7 กิโลเบส เข้าไปในพลาสมิด pQE60 แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE60-mChiA เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ M15 พบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้านสามารถผลิตโปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน ปริมาณมากเมื่อทำการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วย 0.5 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 5-8 ชั่วโมง หลังจากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี Ni²⁺ NTA agarose chromatography เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS/PAGE พบแถบโปรตีนเดี่ยวมีขนาด 63 กิโลดาลตันตามที่คาดไว้ ผลการวิเคราะห์มวลของเปปไทด์ที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินด้วย MALDI-TOF MS และ ESI MS แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้คือโคติเนส เอ การศึกษาการสลายสับสเตรทโดยเทคนิค HPLC MS พบว่าโคติเนส เอ มีลักษณะเป็นเอนโคโคติเนสที่สลายสายโคติเนสให้ผลิตผลเป็นไกลโคโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ และผลิตผลสุดท้ายคือไกลโคโบไอส (GlcNAc₂) เมื่อทำปฏิกิริยาการสลายที่เวลาสั้น ๆ พบว่าอะโนเมอร์หลักของน้ำตาลผลิตผลมีลักษณะเป็นบีต้าอะโนเมอร์ซึ่งบ่งบอกว่าโคติเนสสลายสับสเตรทโดยกลไกแบบ 'retaining mechanism' การศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่าเอนไซม์มีความชอบสูงสุดกับน้ำตาลหกหน่วย ดังนั้นบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์น่าจะประกอบด้วยหกบริเวณย่อย ผลของการกลายพันธุ์ให้ข้อมูลว่า Glu315 มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา และการเปลี่ยน Asp392 ให้เป็น Asn ทำให้โคติเนสสามารถเร่งปฏิกิริยา transglycosylation ได้ดีขึ้น การศึกษาการตกผลึกโดยวิธี hanging drop vapor diffusion พบผลึกโคติเนสในสภาวะที่มี 10%(v/v) PEG4000 ใน 0.1 M sodium acetate, pH 4.6 และ 0.125 M CaCl₂ การวิเคราะห์ข้อมูลทาง crystallography เบื้องต้นพบว่าผลึกโคติเนสมี space group เป็นแบบ tetragonal P422 ประกอบด้วยสองโมเลกุลต่อ asymmetric unit และให้ค่า resolution สูงสุดเป็น 2.14 Å

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research describes cloning of a 1.7-kB chitinase A from *Vibrio carchariae* into the plasmid pQE60. When the recombinant plasmid pQE-mchiA was transformed into bacterial host cells *E. coli* strain M15, chitinase A of 63 kDa was highly expressed under the protein-induced condition containing 0.5 mM IPTG at 25°C for 5- 8 hours. After protein purification using Ni²⁺ NTA affinity chromatography, the protein was subjected of SDS/PAGE analysis, in which a single band of expected size of 63 kDa was detected. Tryptic peptide mass analysis by MALDI-TOF and ESI MS demonstrated that the obtained recombinant protein was chitinase A. A study of substrate hydrolysis using HPLC-MS suggested that the enzyme acts as an endochitinase by cleaving a chitin chain into small chitooligosaccharide fragments and produced chitobiose (GlcNAc₂) as the end product. When hydrolytic reactions were carried out at initial time, the beta anomer was found to be the major product, indicating that *V. carchariae* chitinase catalyzes the reaction through 'the retaining mechanism'. A kinetic study showed that chitinase A has highest affinity towards hexaNAG, which implied that the substrate binding site of the enzyme may comprise six binding subsites. Data obtained from point mutations revealed that the residue Glu315 is essential for catalysis and a substitution of Asp392 to Asn resulted in improve in the transglycosylation activity of the enzyme. Protein crystallization using the hanging drop vapor diffusion method was tried and a single crystal of chitinase was observed under the condition containing 10% (v/v) PEG4000 in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.6 and 0.125 M CaCl₂. Initial crystallographic data analysis suggested that the chitinase crystal has a tetragonal space group *P*422, contained two molecules per asymmetric unit and gave highest resolution of 2.4 Å.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3. ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1. การออกแบบ โอลิโกนิวคลีโอไทด์และการเพิ่มจำนวนยีน <i>mChi A</i> โดยเทคนิค PCR.....	5
2.2. การโคลนยีนไคตินเนส เอ	5
2.3. การผลิตรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ใน <i>E. coli</i> และการทำบริสุทธิ์โดย โครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะ.....	6
2.4. การทำ peptide mass fingerprinting โดย MALDI-TOF/MS หรือ nano ESI MS/MS	7
2.5. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์	7
2.6. การศึกษาคุณสมบัติการสลายไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์.....	8
2.7. การกลายพันธุ์โดยเทคนิค site-directed mutagenesis.....	8
2.8. การศึกษาปฏิกิริยา transglycosylation ของเอนไซม์ไคตินเนส เอ	10
2.9. การสร้างผลึกโปรตีนและการศึกษาโครงสร้างสามมิติของไคตินเนส เอ	10
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์	
3.1. การโคลนยีนไคตินเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรีย <i>V. carchariae</i>	11
3.2. การผลิตรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ และการทำบริสุทธิ์	12
3.3. การทำ peptide mass fingerprinting โดยวิธี Mass spectrometry.....	14

3.4. การศึกษาความสามารถในการสลายโคตินของรีคอมบิแนนท์โคตินเนส เอ.....	15
3.5. การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์.....	16
3.6. การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโน Glu315 และ Asp392 ในการเร่งปฏิกิริยา...	17
3.7. การสังเคราะห์โคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ผ่านปฏิกิริยา transglycosylation.....	18
3.8. การศึกษาเบื้องต้นทางโครงสร้างของเอนไซม์โคตินเนส เอ	19
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	26
ภาคผนวก ข	28
ประวัติผู้วิจัย	30

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของไคติน โพลีเมอร์.....	1
1.2 วิธีการสลายไคติน	2
2.1 หลักการทำ point mutation โดยวิธี QuikChange Site Directed Mutagenesis	9
3.1 การวิเคราะห์หา PCR product ของ mChiA	11
3.2 การวิเคราะห์การนำเข้าดีเอ็นเอ mChiA สู่ pQE60 expression vector.....	12
3.3 SDS/PAGE แสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ M15	13
3.4 การทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ โดยวิธี Ni-NTA agarose gel electrophoresis..	14
3.5 HPLC-MS chromatogram ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายไคตินด้วยรีคอมบิแนนท์ ไคตินเนส เอ.....	16
3.6 การแสดงออกและการสลายสับสเตรทของไคตินเนส เอ กลายพันธุ์	18
3.7 ปฏิกริยา transglycosylation ที่เกิดจากไคตินเนส เอ	19
3.8 ผลึกของรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ	20

สารบัญตาราง

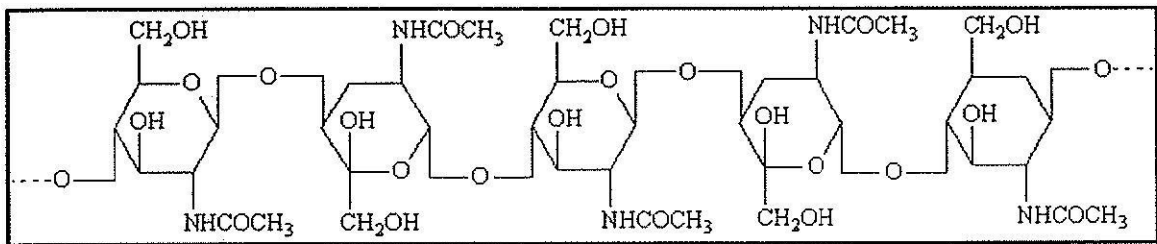
ตารางที่	หน้า
2.1 ขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน Chi A โดยเทคนิค PCR	5
2.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการสร้างไลติเนสกลายพันธุ์.....	8
3.1 การวิเคราะห์มวลของเปปไทด์ด้วยวิธี MALDI-TOF และ nano ESI mass spectrometry..	15
3.2 ค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์ไลติเนส เอ.....	17
3.3 ค่าทางสถิติของ crystallographic data ของผลึก โปรตีน ไลติเนส เอ.....	21

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลเอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine) หน่วยย่อย ๆ มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง $\beta 1 \rightarrow 4$ ดังรูปที่ 1.1

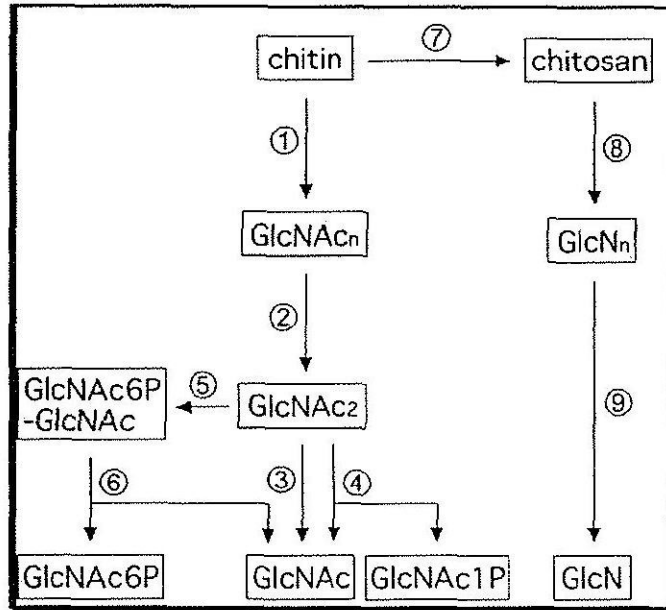


รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคติน โพลีเมอร์ (แหล่งที่มา: http://www.kittolife.co.kr/eng_html/img/bus1_10.gif)

ไคตินเป็นโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลส โดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ตันต่อปี [1] ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตรกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ

เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่นอาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะที่การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมีทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิบัติการเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิบัติการย่อยสลาย

การย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดด้วยขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลีเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (EC3.2.1.14) ให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ขั้นตอนต่อมาคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ด้วยเอนไซม์ไคโตไบเอส หรือ เอ็น-อะซิติก-บีต้า-ดี-กลูโคซามิไนด์ เอ็น-อะซิติกกลูโคซามิโนไฮโดรเลส (chitinase/*N*-acetylglucosamino hydrolase) (EC 3.2.1.52)^[2] รูปที่ 1.2 แสดงวิธีการสลายไคตินที่ต้องการเอนไซม์ไคตินเนสและไคโตไบเอสโดยแบคทีเรีย



รูปที่ 1.2 วิธีการสลายไคติน เอนไซม์ 1, endochitinase; 2, exochitinase; 3, Chitinase; 4, GlcNAc₂ phosphorylase; 5, GlcNAc₂ phosphotransferase system; 6, 6-phospho-D-glucosaminidase; 7, chitin deacetylase; 8, chitosanase; and 9, GlcNase (แหล่งที่มา: Tanaka et al. J Bact 2003, 5175-5181)

เอนไซม์ไคตินเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่างของพืช และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล และสัตว์เคี้ยวเอื้อง หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา^[3,4,5] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอนไซม์นี้มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่^[6,7] มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลงและปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทรา ปลาชิบาส เป็นต้น^[8,9,10] นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) แก่ที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา^[11] ส่วนในพืชเอนไซม์นี้มีส่วนในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช^[12,13] และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช^[14]

ได้มีการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี Vibrionaceae เป็นแหล่งเอนไซม์โคติเนสที่สำคัญ ในธรรมชาติแบคทีเรียนี้จะผลิตและหลั่งเอนไซม์ออกจากเซลล์เพื่อย่อยสลายโคติเนสที่สะสมหรือเป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น สาหร่ายสีเขียว ไคอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์^[15,16,17] ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแหล่งเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioconversion process) ได้มีการวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาทางโมเลกุลเพื่อศึกษาองค์ประกอบของระบบยีนโคติเนสในแบคทีเรีย^[18,19] แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia marcescens*^[20] เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่น การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา^[21] การเกษตร เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย เป็นต้น ให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราต่างๆ^[22] และทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียโคติเนสและนำผลผลิตจากการย่อยโคติเนสไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านการแพทย์และการเกษตร^[23,24]

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักอยู่ 5 ประการคือ

1. การโคลนยีน *Chi A* ของแบคทีเรีย *V. carchariae* และการผลิตรีคอมบิแนนท์โคติเนส เอ ที่ทำงานได้ในระบบ *E. coli*
2. การพัฒนาวิธีการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โคติเนส เอ โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี
3. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์และคุณสมบัติของรีคอมบิแนนท์โคติเนส เอ
4. การตรวจหากรดอะมิโนที่สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยเทคนิค sited-directed mutagenesis
5. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โคติเนส เอ

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตงานวิจัยนี้แบ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นด้วยการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์และการใช้เทคนิค PCR ทำการเพิ่มจำนวนยีน *Chi A* ที่สกัดจากจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* หลังจากนั้นนำยีน *Chi A* ที่ได้โคลนเข้าไปในพลาสมิดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ขั้นตอนต่อมาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้ transformed *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณมาก และการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี หลังจากที่ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์แล้วจะทำการศึกษาคูณสมบัติทางจลนพลศาสตร์และรูปแบบการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ

การศึกษานี้จะดำเนินการไปพร้อมกับการสร้างผลึกโปรตีนเพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ชั้นตอนสุดท้ายคือการทำารกลายพันธุ์โปรตีนไคตินเนส เอ โดยเทคนิค site-directed mutagenesis เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาการสลายไคติน

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เข้าใจหน้าที่ของเอนไซม์ไคตินเนส เอ จากสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae*
2. เข้าใจโครงสร้างสามมิติเพื่อความเข้าใจในกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้ซึ่งนำไปสู่การอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ในการสลายสับสเตรท
3. เข้าใจบทบาทของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสามารถหาแนวทางการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์นี้ให้เหมาะสมเพื่อนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ การอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์และการเพิ่มจำนวนยีน *mChi A* โดยเทคนิค PCR

เพื่อทำการโคลนยีน *Chi A* เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* การทดลองเริ่มต้นคือการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์สองเส้น (Sigma-Proligo, Singapore) โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Chi A* ที่มีอยู่แล้ว [25] เส้น sense strand มีลำดับของนิวคลีโอไทด์เป็น 5'-TATGCCATGGTAATTCGATTACCTATG-3' โดยที่นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ *Nco* I cloning site ส่วนเส้น anti-sense strand มีลำดับของนิวคลีโอไทด์เป็น 5'-GAAGATCTACGGTTTGGTGGGGTAACGAC-3' โดยที่นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ *Bgl* II cloning site ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ใช้คือพลาสมิด pBluescript II KS (-) ที่มียีน *Chi A* บรรจุอยู่ เอนไซม์ polymerase ที่ใช้คือ *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA) สภาพที่ใช้ในการปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ขั้นตอนและสภาพที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *Chi A* โดยเทคนิค PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hotstart	95	3 นาที	1
2. Denaturation	95	30 วินาที	30
3. Annealing	50	30 วินาที	30
4. Extension	72	1 นาที	30
5. Final extension	72	7 นาที	1

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบเส้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นโดยการทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เมื่อทำการย้อมดีเอ็นเอแล้วทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดขนาด 1.7 kB แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DNA gel extraction kit (QIAGEN, USA) และวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

2.2. การโคลนยีนไคตินเอส เอ

นำดีเอ็นเอขนาด 1.7 kB ที่เตรียมได้ในข้อ 2.1. มาทำ direct ligation เข้ากับ pDrive TA cloning vector ตามวิธีของ QIAGEN ([www.ebiotrade.com/buy/f/products/qiagen/1016726HBDNYPCR Cloning401 WW.pdf](http://www.ebiotrade.com/buy/f/products/qiagen/1016726HBDNYPCR%20Cloning401%20WW.pdf)) แล้วนำพลาสมิด pDrive-ChiA เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิดดีเอ็นเอให้

ได้ปริมาณที่มากพอ ต่อจากนั้นทำการสกัดพลาสมิด pDrive-Chi A โดยการใช้ plasmid miniprep kit (QIAGEN) ขั้นตอนต่อมาคือทำการย่อย 5 μ g ของ pDrive-ChiA และพลาสมิด pQE 60 (QIAGEN) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bgl* II เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 37 ° ซ แล้วทำการเชื่อมดีเอ็นเอทั้งสองเข้าด้วยกันเข้าที่ตำแหน่ง *Nco* I ที่ด้านปลาย 5' และตำแหน่ง *Bgl* II ที่ด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอ Chi A หลังจากนั้น transform พลาสมิดทั้งหมด เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้ว streak เชื้อในอาหารแข็งสูตร LB ที่มี 100 μ g/ml ampicillin และ 50 μ g/ml kanamycin หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ 37 ° ซ ทำการตรวจหาโคโลนีสีขาวที่มีพลาสมิด pQE60-ChiA บรรจุอยู่

2.3. การผลิตรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ใน *E. coli* และการทำบริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะ

เมื่อตรวจหาโคโลนีที่มีพลาสมิด pQE60-Chi A แล้ว ต่อมาทำการสกัดพลาสมิดดังกล่าวตามวิธีของ QIAGEN แล้วส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์หาความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Chi A อีกครั้งหนึ่ง ขั้นตอนต่อไปคือการ transform พลาสมิด pQE60-ChiA เข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีน Chi A ภายใต้ T5 promoter/Lac operator โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ที่ทำงานได้ ที่สภาวะต่าง ๆ พบว่าเชื้อ *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว LB/Amp จนค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.6 ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ด้วย 0.5 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 25 ° ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ต่อจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ที่ 2,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ หลังจากละลายเซลล์ด้วย lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF และ 1 mg/ml lysozyme) แล้วทำให้เซลล์แตกโดยกระบวนการ ultrasonication เป็นเวลา 30 วินาที 6-8 ครั้ง หลังจากนั้นปั่นเก็บส่วนใสที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ส่วนใสที่ได้เรียกว่า 'crude extract'

ในการทดลองนี้ การทำบริสุทธิ์โปรตีนไคตินเนส ได้เลือกใช้ Ni²⁺ เป็นตัวจับแบบจำเพาะ การทดลองก็นำ crude extract ที่ได้มาผ่านเข้าคอลัมน์ที่มี Ni²⁺ NTA agarose (QIAGEN) เป็นตัวจับ แบบ gravity flow ต่อจากนั้นล้างองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอนไซม์ไคตินเนสออกไปด้วย 10-20 ml ของ washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl และ 5 mM imidazole) ตามด้วยการชะเอาเอนไซม์ไคตินเนสออกจากคอลัมน์ด้วย 10 ml ของ elution buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl และ 250 mM imidazole) นำของเหลวที่ถูกชะออกมา (eluted fraction) ไปผ่าน Vivaspin membrane concentrator (MW cut-off 10,000) เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น นำโปรตีนที่ได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS/PAGE ตามวิธีของ Laemmli [26] และหาความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธีของ Bradford [27]

2.4. การทำ peptide mass fingerprinting โดย MALDI-TOF/MS หรือ nano ESI MS/MS

เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้เป็นเอนไซม์ไคตินเนส ได้นำโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมได้หลังจาก Ni²⁺ NTA agarose affinity column มาทำ SDS-PAGE แล้วย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue แล้วทำการย่อยแถบโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซินด้วยวิธี in-gel digestion [28] หลังจากนั้นวิเคราะห์หามวลของเปปไทด์ที่ย่อยได้ด้วย MALDI-TOF MS (Voyager-DE Pro) โดยใช้ Reflective index mode แล้วนำข้อมูล peptide mass ที่ได้ทั้งหมดมาทำ database bank search โดยโปรแกรม “Sequest search” (<http://prospector.ucsf.edu>) หรือการวิเคราะห์หา peptide mass โดยวิธี nano ESI MS/MS (Thermo Finnigan LCQ Deca) จะทำ data bank search โดยใช้โปรแกรม “MS-Fit” (<http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>)

2.5. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของการสลาย ไคติน ไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และ pNP-[GlcNAc]_{2,3} ทำโดยวิธี quantitative HPLC MS ปฏิกริยาการสลายไคติน ทำในปริมาตร 100 μ l โดยปฏิกริยาประกอบด้วย 75 ng ไคตินเนส, 0-1 mg/ml colloidal chitin, 50 mM sodium acetate buffer, pH 7.1 ทำปฏิกริยาเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20^o ซ หลังจากนั้นหยุดปฏิกริยาด้วยการเติม 10% (v/v) acetic acid แล้วปั่นตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4^o ซ ส่วนของไคตินที่เหลืออยู่ ส่วนปฏิกริยาการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และ pNP-glycoside ปฏิกริยา 100 μ l ประกอบด้วยไคตินเนสบริสุทธิ์ (100 ng) สับสเตรทคือ GlcNAc_{2,6} (0.065-2 mM) หรือ pNP substrate (0-1 mM) ใน 50 mM ammonium acetate, pH 7.1 หลังจากทำปฏิกริยาเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20^o ซ จึงทำการหยุดปฏิกริยาด้วยการเติม 10% (v/v) acetic acid แล้วนำ 60 μ l ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent Technologies, Germany) ที่ต่อกับเครื่อง MS (Thermo Finnigan, Thermo electron Corporation, USA) ต่อจากนั้นทำการแยกน้ำตาลผลิตผลที่ได้จากปฏิกริยาการสลายด้วยระบบ HPLC ที่ต่อกับคอลัมน์ Hypercarb (Thermoquest Thermo Electron Cooperation, USA) โดยใช้ linear gradient (0-40%) ของ acetonitrile อุณหภูมิในการแยกคือ 40^o ซ และตรวจหาน้ำตาลGlcNAc₂ (m/z 425.5) ที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง electrospray ion-trap mass spectrometer โหมดที่ใช้วิเคราะห์คือ Single Ion Monitoring Mode (SIM) หลังจากนั้นวัดหาปริมาณผลิตผลหลัก (GlcNAc₂) ที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของ GlcNAc₂ ในช่วง 0-2 nanomol หลังจากนั้นคำนวณหาค่า K_m , V_{max} และ k_{cat} จากกราฟ Lineweaver-Burk

2.6. การศึกษาคุณสมบัติการสลายไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์

ปฏิกิริยาการสลายไคติน และไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ทำการทดลองเหมือนการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ในหัวข้อ 2.5 แต่เลือกใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทความเข้มข้นเดียวคือ colloidal chitin ใช้ 200 µg/ml ไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ใช้ 1.0 mM ส่วนปริมาณเอนไซม์ใช้ 50 ng/ml ส่วน time course ของการสลายสับสเตรททั้งสองชนิดทำที่เวลาต่าง ๆ คือ 0 2.5 5.0 10 30 45 และ 60 นาที

2.7. การกลายพันธุ์โดยเทคนิค site-directed mutagenesis

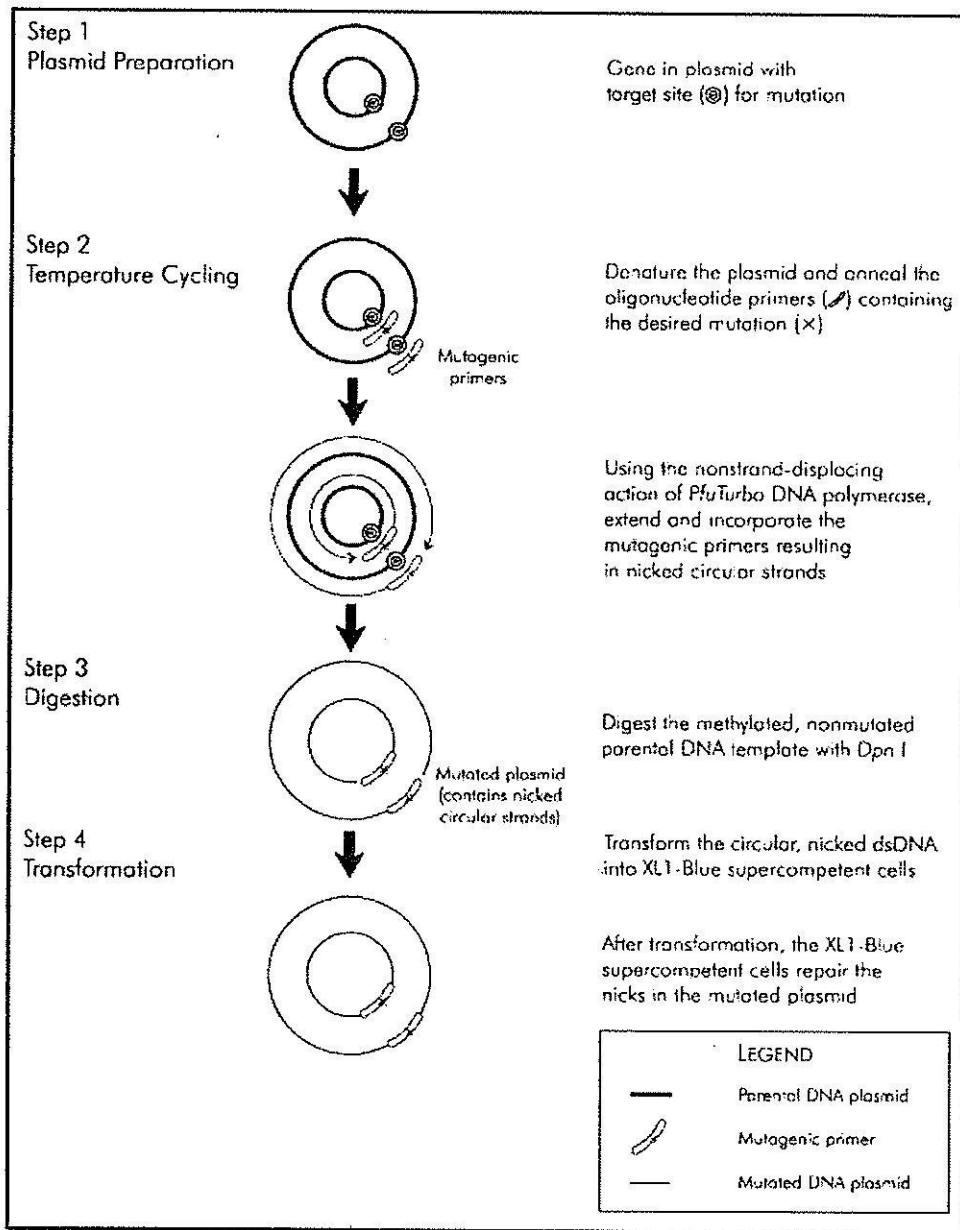
การกลายพันธุ์เอนไซม์ไคตินเนสโดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนสองตัวคือ Glu315 และ Asp392 ทำโดยใช้ QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA) ดีเอ็นเอต้นแบบคือ pQE60-ChiA และใช้เอนไซม์ *Pfu turbo DNA polymerase* ในปฏิกิริยาการต่อสายดีเอ็นเอ ส่วน โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอกลายพันธุ์แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการสร้างไคตินเนสกลายพันธุ์

โปรตีนกลายพันธุ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
D392N	Forward 5' -CTTTGCGATGACTTACAAC*TTCTACGGCGG-3'
	Reverse 5' -CAGCCGCCGTAGAAAGTTGTAAGTCATC GCAAAG-3'
E315M	Forward 5' -GTAGATATTGACTGGATGTTCC CTGGTGGCGGCG-3'
	Reverse 5' -CGCCGCCACCAGGGAACATCCAGTCAATATCTAC-3'
E315Q	Forward 5' -GATATTGACTGGCAATTCCTGGTGGCGGC -3'
	Reverse 5' -GCCG CCACCAGGGAATTGCCAGTCAATATCTAC-3'

*นิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือ codon ที่เปลี่ยนไป

หลักการสร้างดีเอ็นเอกลายพันธุ์ทำตามวิธีที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ของ Stratagene ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 หลักการทำ point mutation โดยวิธี QuickChange Site Directed Mutagenesis (แหล่งที่มา: QuickChange® Site Directed mutagenesis's Instruction Manual, Stratagene)

โคโลนีที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายจะนำมาสกัดเอาพลาสมิด pQE60 ที่มียีนที่กลายพันธุ์ออกมาทำการตรวจสอบความถูกต้องของนิวคลีโอไทด์โดยวิธี automated DNA sequencing (BSU, Thailand) ก่อนเริ่มทำการผลิตโปรตีนกลายพันธุ์เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์ต่อไป

2.8. การศึกษาปฏิกิริยา transglycosylation ของเอนไซม์โคติเนส เอ

ปฏิกิริยา transglycosylation (100 μ l) ประกอบด้วย 1 mM GlcNAc₄ กับ 100 ng เอนไซม์โคติเนส wild-type หรือ 500 ng D392N ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.1 ทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 20° ซ เป็นเวลา 0 5 10 15 30 45 และ 60 นาที ที่เวลาต่าง ๆ ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 μ l 20% (v/v) acetic acid และนำ 20 μ l ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC MS โดยเลือก m/z ที่วิเคราะห์ในช่วง 200-2000

2.9. การสร้างผลึกโปรตีนและการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโคติเนส เอ

การทดสอบสถานะในการสร้างผลึกโปรตีน โคติเนสเริ่มต้นด้วยการตกผลึกด้วยวิธี Microbatch ซึ่งทำใน 96-well Impact plate (Hampton Research, CA, USA) ที่มี 10 μ l AI's oil อยู่ ต่อจากนั้นทำการหยุดโปรตีนความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 0.5 μ l ลงไปในแต่ precipitant ที่ซื้อมาจากหลายบริษัท เช่น Hampton Research หรือ JB Screen HTSI และ HTSII (Jena Bioscience GmbH, Germany) จากการตรวจหาผลึกโปรตีนในตัว precipitant ทั้งหมด พบผลึกขนาดเล็กใน condition A1 ของ JB Screen HTSI ในวันที่สี่ของการตกผลึก ที่อุณหภูมิ 16° ซ จึงได้นำผลึกโปรตีนที่สภาวะดังกล่าวไปหาสภาวะที่เหมาะสม ต่อโดยวิธี Hanging drop vapor diffusion โดยทำการหยุดโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 1 μ l ลงไปในตัว precipitant ที่เป็น PEG400 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-16 % (v/v) และ CaCl₂ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.05M พบว่าผลึกเดี่ยว (single crystal) ขนาดใหญ่ที่เป็น ที่ 10% (v/v) PEG400 และ 0.125 M CaCl₂ ในบัฟเฟอร์ 0.1M sodium acetate pH 4.6

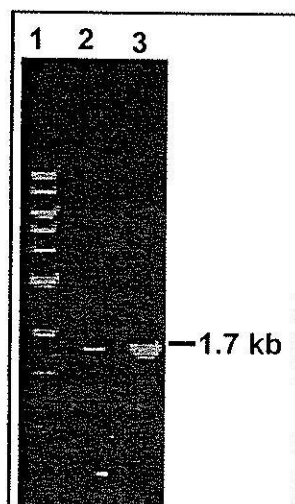
การทดลองต่อไปคือการเกี่ยวผลึกโปรตีนที่ได้ใส่ลงไปใน cryoprotectant ที่ประกอบด้วย 20% (v/v) glycerol และ 10%(v/v) PEG400 + 0.125 M CaCl₂ ในบัฟเฟอร์ 0.1M sodium acetate pH 4.6 เป็นเวลา 10 วินาที แล้วเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นนำผลึกโปรตีนไปผ่านรังสีเอ็กซ์โดยใช้เครื่องกำเนิดรังสีเอ็กซ์รุ่น RU-H3R rotating anode X-ray generator ที่ต่อกับตัว detector รุ่น Rigaku/MS R-AXIS IV++ และ Osmic Blue confocal focusing mirrors โดยให้ระยะทางระหว่างผลึกกับตัว detector เป็น 190 มิลลิเมตร เครื่องถูกกำหนดสนามความต่างศักย์ไว้ที่ 50 กิโลโวลต์และกระแสไฟฟ้าที่ 100 มิลลิแอมแปร์ ทำการบันทึกข้อมูลการหักเหรังสีเอ็กซ์ที่อุณหภูมิ -161° ซ โดยบันทึกข้อมูลจากมุมของการหมุนทุก ๆ 65 องศา เป็นจำนวน 265 ภาพ ต่อจากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Crystal-Clear/d*TREK [29]

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

3.1. การโคลนยีนไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae*

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบคือ pBluescript II KS (-)-pChiA ดังอธิบายตามขั้นตอน 2.1. ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการทำ agarose gel electrophoresis (รูปที่ 3.1) พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1.7 kB บนแผ่นเจล ซึ่งดีเอ็นเอดังกล่าวจะถอดรหัสให้โปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์ไคติเนสที่แบคทีเรีย *V. carchariae* ผลิตออกมาออกเซลล์และเป็นรูปเอนไซม์ที่ทำงานได้เต็มที่ (active, mature chitinase A) [30] ดังนั้นจึงเรียกดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยวิธีทาง PCR นี้ว่า 'mChiA'

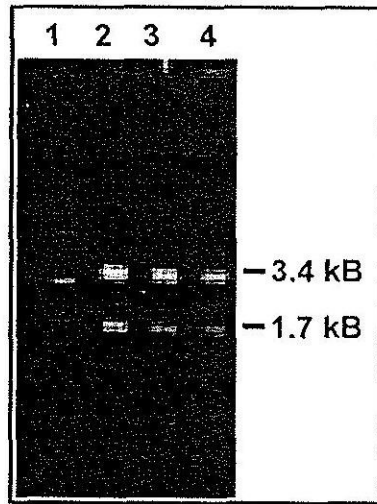


รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์หา PCR product ของ mChiA

ดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้คือพลาสมิด pBluescript II KS (-)-pChiA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1-kB ladder); 2: PCR product ปริมาณ 1 ug และ 3: PCR product ปริมาณ 5 ug

PCR product ขนาด 1.7 kB ที่ได้จะมี NcoI cloning site อยู่ที่ปลายด้าน 5' และ Bgl II cloning site อยู่ที่ปลายด้าน 3' เมื่อทำการโคลน PCR product ดังกล่าวเข้าไปใน pDrive cloning vector โดยการทำเชื่อมสายดีเอ็นเอของ PCR product เข้าไปโดยตรงที่ TA cloning site แล้วเลือกโคโลนีที่ขาวบนอาหารแข็ง LB/Amp มาสกัดเอาพลาสมิด pDrive-mchiA ออกมา ต่อจากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองตัวคือ NcoI/Bgl II หลังจากนั้นทำการเชื่อมดีเอ็นเอ mChiA ที่มีปลายทั้งสองเป็น sticky ends เข้ากับพลาสมิด pQE60 (3.4 kB) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แล้วทำการ transform เข้าแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α รูปที่ 3.2

แสดงพลาสมิด pQE60-mchiA ที่สกัดออกมามากแล้วทำการย่อยด้วย NcoI/Bgl II ผลการวิเคราะห์พบดีเอ็นเอ สองขนาดบนแผ่น agarose gel ดีเอ็นเอชิ้นที่หนึ่ง มีขนาด 3.4 kB ซึ่งน่าจะเป็นชิ้นส่วนของพลาสมิด pQE60 ส่วนดีเอ็นเอชิ้นที่สองมีขนาด 1.7 kB น่าจะเป็นส่วนของ DNA insert คือ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าได้มีการนำดีเอ็นเอ mChiA เข้าสู่ pQE60 ซึ่งเป็น expression vector ได้สำเร็จ

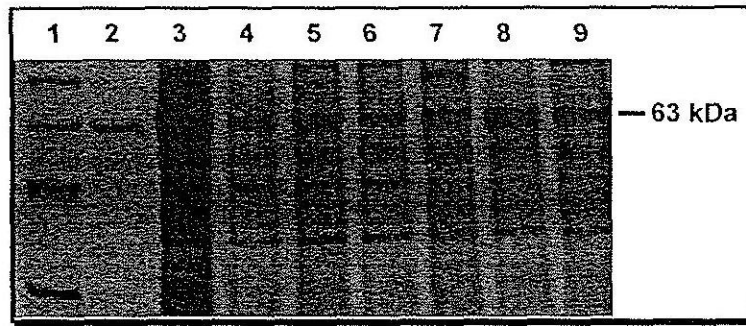


รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์การนำเข้าของดีเอ็นเอ mChiA สู่อ pQE60 expression vector บน 1% agarose gel

ช่องที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1-kB ladder); 2: พลาสมิด pQE60-mchiA ที่ย่อยด้วย NcoI/Bgl II ปริมาณ 5 ug; 3: พลาสมิด pQE60-mchiA ที่ย่อยด้วย NcoI/Bgl II ปริมาณ 3 ug และ 4: พลาสมิด pQE60-mchiA ที่ย่อยด้วย NcoI/Bgl II ปริมาณ 2 ug

3.2. การผลิตรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ และการทำบริสุทธิ์

เมื่อตรวจสอบพบ DNA insert ในพลาสมิด pQE60 แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการตรวจสอบความถูกต้องของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด โดยส่งพลาสมิด pQE60-mChiA ไปทำ DNA sequencing พบว่านิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมีความถูกต้องเมื่อเทียบกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน ChiA ที่ได้สกัดออกมาจากเชื้อ *V. cartharicae* [25] การทดสอบความสามารถในการแสดงออกของยีน mChiA ที่สภาวะต่าง ๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 สามารถผลิตโปรตีนในรูปที่ทำงานได้มากที่สุดคือ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB/Amp ที่ 37° ซ จนเซลล์ให้ค่า OD₆₀₀ อยู่ในช่วง 0.6-1.0 แล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ ก่อนทำการเติม 0.5 mM IPTG เพื่อกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ปริมาณโปรตีนที่เก็บได้หลังจากบ่มเชื้อต่อไปที่ 25° ซ เป็นเวลา 5-8 ชั่วโมง

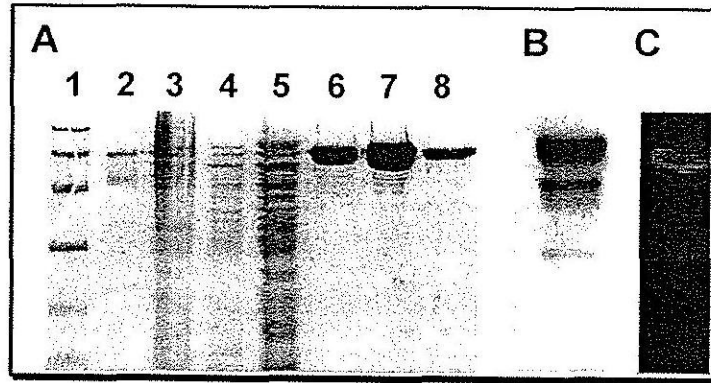


รูปที่ 3.3 SDS/PAGE แสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ *E. coli* สายพันธุ์ M15

สภาวะที่ใช้กระตุ้นการสร้างโปรตีนคือ 0.5 mM IPTG ที่ 25° ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ช่องที่ 1: Low MW protein standard; 2: ไคตินเนส เอ บริสุทธิ์จาก *V. carchariae*; 3-9: โคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่ 1-7 ที่มีพลาสมิด pQE60-mChiA อยู่

ดังแสดงในรูปที่ 3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ของโคโลนี M15 ทั้งเจ็ดโคโลนีที่มีพลาสมิด pQE60-mChiA อยู่ พบว่าโคโลนีทั้งหมดสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ได้เนื่องจากพบแถบเข้มของโปรตีนบนแผ่นเจลอะครีลาไมด์ขนาด 63 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดของโปรตีนดังกล่าวตรงกับขนาดของเอนไซม์ไคตินเนสที่สกัดได้จากเชื้อ *V. carchariae* (รูปที่ 3.3. ช่องที่ 2) นอกจากนี้จากจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ได้ทดสอบพบว่าโคโลนีที่ 1 และ 6 มีระดับของโปรตีนได้มากกว่าโคโลนีอื่น ๆ แต่ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละโคโลนีที่ไม่เท่ากันก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามในการทดลองต่อไปได้คัดเลือกโคโลนีที่ 6 มาเลี้ยงและผลิตโปรตีนเนื่องจากระดับของโปรตีน 63 กิโลดาลตันมีมากแต่มีระดับของการผลิตโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการน้อย ซึ่งคิดว่าน่าจะทำการทำบริสุทธิ์จะทำได้ง่าย

ในขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ อาศัยหลักการที่ว่ารีคอมบิแนนท์ไคตินเนสเอที่ผลิตออกมาจะมีกรดอะมิโนฮิสทีดีนหกตัว (hexahistidine tag) ติดอยู่ที่ด้าน C-terminus ซึ่งสามารถจับแบบจำเพาะกับ divalent cation เช่น Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} หรือ Ni^{2+} จึงใช้หลักการนี้ในการพัฒนาทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ไคตินเนสโดยวิธี single step purification โดยใช้ Ni-NTA agarose เป็นตัวจับแบบจำเพาะ รูปที่ 3.4 แสดงการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส



รูปที่ 3.4 การทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ โดยวิธี Ni-NTA agarose gel electrophoresis

รูป A คือ การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS/PAGE ช่องที่ 1: Low MW protein standard; 2: ไคตินเนส เอ บริสุทธิ์จาก *V. carchariae*; 3: crude enzyme; 4-5: washed fraction ที่ 1-2; และ 6-8: fraction ที่ 3-5 ที่ถูกชะด้วย 250 mM imidazole รูป B คือ Western blot analysis ของ pooled fraction 3-5 ที่ตรวจจับด้วย anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies และรูป C คือ gel activity assay ของ pooled fraction 3-5 โดยใช้ไกลคอลไคตินเป็นสับสเตรท

ผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าสามารถทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ ได้โดยวิธีโครมาโตกราฟีชั้นคอนเดียวที่มี Ni^{2+} -NTA เป็นตัวจับแบบจำเพาะ เนื่องจากมีแถบของโปรตีนหลักที่ถูกชะออกมาด้วย 250 mM imidazole คือโปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน เมื่อทำการรวม fraction ที่ 3-5 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย Western blotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies เป็นตัวตรวจจับ พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์เกิด cross-react กับแอนติบอดีเป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นแถบเล็ก ๆ ของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตันที่ทำปฏิกิริยากับ anti-chitinase เช่นเดียวกัน โปรตีนนี้น่าจะเป็น degradation product ของไคตินเนสขนาด 63 กิโลดาลตัน ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียม crude extract และการทำบริสุทธิ์ เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการสลายไคตินโดยการทำ gel activity assay พบว่าเกิดการเรืองแสงรอบ ๆ แถบโปรตีนขึ้นแสดงถึงปฏิกิริยาการสลายไคตินบนแผ่นเจล ผลการทดลองดังกล่าวยืนยันว่าโปรตีนบริสุทธิ์มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ไคตินเนส

3.3. การทำ peptide mass fingerprinting โดยวิธี Mass spectrometry

จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไคตินเนสบริสุทธิ์ที่ได้โดยวิธี MALDI-TOF พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเป็น $62,698 \pm 15$ ดาลตันซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของไคตินเนสที่ได้จากการทำนายจากจำนวนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไคตินเนสที่ได้จากการโคลนนิ่ง คือ 62,718.12 ดาลตัน^[25] และเมื่อทำการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซินโดยการทำ In-gel digestion แล้ววิเคราะห์เพป

โหนดที่ได้ด้วยวิธี MALDI-TOF หรือ nano ESI MS แล้วนำค่า monoisotopic mass ของเปปไทด์ทั้งหมด submit เข้าไปใน protein databank ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การวิเคราะห์ห้วงมวลของเปปไทด์ด้วยวิธี MALDI-TOF และ nano ESI mass spectrometry (แหล่งที่มา: Suginta et al., Arch Biochem Biophys 2004, 171-180)

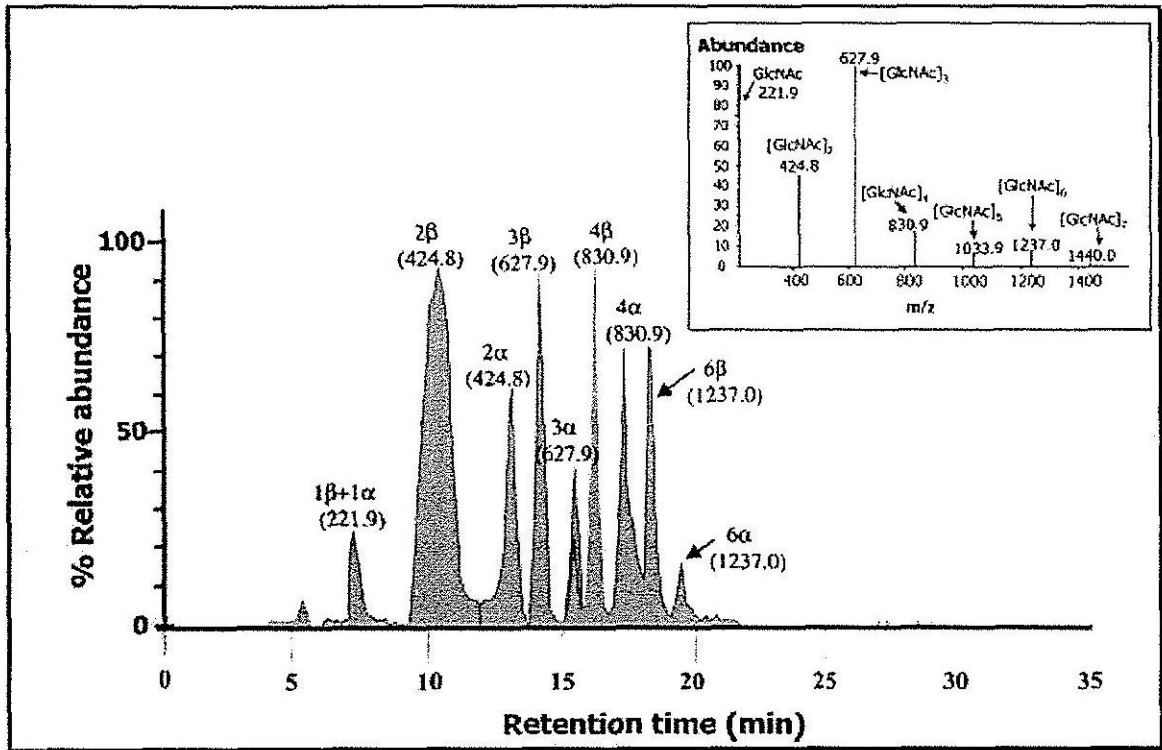
Position in the sequence ^a	Tryptic peptide	Expected mass	Observed mass	Peptide AA sequence
22-40	T1	2040.0	2040.7	APTAPSIDMYGSNNLQFSK
41-56	T2	1800.8	1800.5	IELAMETTSGYNDMVK
57-62	T3	759.4	759.3	YHELAK
67-86	T6	2284.0	2283.8	FNQWSGTSGDTYNVYFDGVK
124-151	T8	2976.5	2976.6	SAPVEITADTDGSHLKPLTMNVDPNNK
152-173	T9	2554.2	2553.6	SYNTDPSIVMGTYFVWGIYGR
204-218	T11	1523.7	1523.6	SVGGNSFNALQTAC
219-236	T12	2103.0	2102.8	GVNDYEVVIHDPWAAAYQK
237-250	T13	1560.8	1560.7	SFPQAGHEYSTPIK
251-262	T14 + T15	1394.7	1394.5	GNYAMLMLKQR
268-288	T17 + T18	2397.2	2397.0	IIPSIGGWTLSDPFYDFVDKK
289-298	T19 + T20	1135.6	1135.6	NRDTFVASVK
303-326	T23 + T24	2601.2	2601.2	TWKFPYDGVWDIDWEPFGGGGAAADK
327-341	T25	1587.8	1587.6	GDPVNDGPAYIALMR
345-356	T27	1361.7	1361.7	VMLDELEAETGR
454-463	T31	1079.6	1079.6	LVLGTAMYGR
464-487	T32	2460.1	2460.1	GWEGVTPDTLIDPNDPMTGTATGK
488-505	T33 + T34	1965.0	1964.8	LKQSTAQQVWEDGVIDYK
509-538	T36	3377.5	3378.5	SFMLGANNTGINGFEYGYDAQAEAPVWVNR
539-550	T37	1389.7	1389.6	STGELITFDHR
551-555	T38	516.3	516.5	SVLAK
556-560	T39	551.3	551.3	GNYAK

^a Unidentified peptides are not included.

จากตารางพบว่ามีจำนวนเปปไทด์ทั้งหมด 39 เปปไทด์ที่ให้ค่ามวลสอดคล้องกับค่ามวลคำนวณของเปปไทด์ของโคติเนส เอ นอกจากนี้เปปไทด์ทั้งหมดยังมีลำดับของกรดอะมิโนตรงกับลำดับของกรดอะมิโนที่พบในสายโพลีเปปไทด์ของโคติเนส เอ อีกด้วย ดังนั้นข้อมูลจากการทำ peptide mass fingerprinting จึงยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตจาก *E. coli* สายพันธุ์ M15 เป็นเอนไซม์โคติเนส เอ นั่นเอง

3.4. การศึกษาความสามารถในการสลายโคตินของรีคอมบิแนนท์โคติเนส เอ

หลังจากที่ได้โคติเนสบริสุทธิ์แล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์ โดยตรวจสอบความสามารถในการสลายโคติน รูปที่ 3.5 แสดงผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการสลายโคติน เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20° ซ ที่ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ESI MS



รูปที่ 3.5 HPLC-MS chromatogram ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายไคตินด้วยรีคอมบิแนนท์ไคติเนส เอ

ตัวเลขแสดงจำนวนของ GlcNAc และอักษรละตินแสดงชนิดของอะโนเมอร์ เช่น 2 β คือน้ำตาลปีศาจอะโนเมอร์ ของ GlcNAc₂ ส่วน inset แสดง mass spectrum ของน้ำตาลผลิตผลขนาดต่าง ๆ (แหล่งที่มา: Suginta et al., Arch Biochem Biophys 2004, 171-180)

ผลการสลายไคตินโดยรีคอมบิแนนท์ให้ไคโตรีโกลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ หลายชนิดตั้งแต่ GlcNAc₂₋₆ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไคติเนสมีลักษณะเป็นเอนโคไคติเนส กล่าวคือเอนไซม์ย่อยพันธะไกลโคซิดิกภายในสายโพลีเมอร์แบบสุ่มได้น้ำตาลสายสั้น ๆ จากรูปที่ 3.5 ผลผลิตหลักของเอนไซม์คือไคโตไบโอส ซึ่งสอดคล้องกับการทำงานของเอนโคไคติเนสที่รายงานจากแหล่งอื่น ๆ เช่น ไคติเนส เอ จาก *S. marcescens* [31] ไคติเนส-1 จากเชื้อรา *Coccidioides immitis* [32] และ hevamine จาก *Hevea brasiliensis* [33] นอกจากนี้ในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยาการสลาย เช่นภายใน 5 นาที จะเห็นว่าเอนไซม์ไคติเนส เอ สลายสายไคติน ได้ปีศาจอะโนเมอร์เป็นผลิตภัณฑ์หลักเมื่อเทียบกับอัลฟาอะโนเมอร์ ผลการทดลองนี้สนับสนุนกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ retaining mechanism [34]

3.5. การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์

การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายใช้สับสเตรทชนิดต่าง ๆ คือ pNP-GlcNAc_{1,2} ไคโตรีโกลิโกแซคคาร์ไรด์ (GlcNAc_{2,3,4,6}) และ colloidal chitin โดยวิธี calibrated HPLC-MS ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์ไคตินเนส เอ (แหล่งที่มา: Suginta et al., FEBS J 2005, 3376-3386)

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot M^{-1}$)
GlcNAc-pNP	No reaction	–	–
(GlcNAc) ₂ -pNP ^a	1.04 ± 0.10	5.78 ± 0.58	5.29 × 10 ³
(GlcNAc) ₂ -pNP ^b	1.05 ± 0.03	5.73 ± 0.16	5.84 × 10 ³
(GlcNAc) ₂	No reaction	–	–
(GlcNAc) ₃ ^b	10.54 ± 1.40	9.71 ± 1.29	9.21 × 10 ²
(GlcNAc) ₄ ^b	2.17 ± 0.29	0.63 ± 0.08	2.89 × 10 ²
(GlcNAc) ₆ ^b	0.19 ± 0.01	5.81 ± 0.19	3.06 × 10 ⁴
Chitin ^b	0.10 ± 0.02 mg·mL ⁻¹	0.07 ± 0.006	–

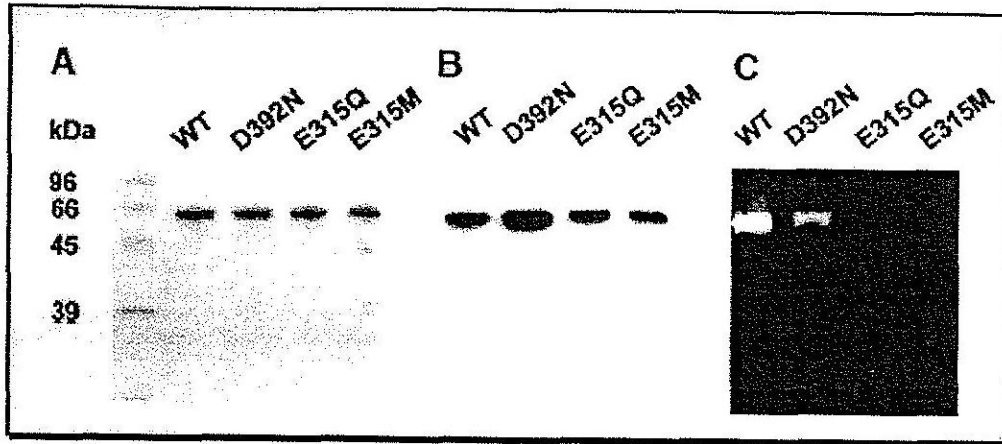
^a Determined by colorimetric assay, ^b determined by HPLC-ESI MS.

ผลการทดลองที่แสดงในตารางข้างบนพบว่าเอนไซม์ไคตินเนส เอ ไม่สามารถใช้สับสเตรทที่เป็นไดแซคคาริไรด์คือ pNP-GlcNAc และ GlcNAc₂ ได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากสับสเตรทอาจมีขนาดเล็กเกินไปจึงไม่สามารถจับกับบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์ได้ เมื่อพิจารณาจากค่า K_m ของสับสเตรทต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีความสามารถจับกับสับสเตรทที่มีขนาดยาวได้ดีกว่าสับสเตรทที่มีขนาดสั้น โดยลำดับของค่า K_m จะเป็นดังนี้ GlcNAc₃ > GlcNAc₄ > GlcNAc₆ ตามลำดับ ค่า K_m ของ GlcNAc₆ ที่มีค่าต่ำสุดแสดงถึงว่าเอนไซม์มีความสามารถในการจับกับน้ำตาลหกหน่วยได้สูงที่สุด ซึ่งบ่งบอกถึงลักษณะของบริเวณเร่งของเอนไซม์ว่าประกอบด้วยบริเวณจับหลาย ๆ บริเวณ อาจมากถึงหกบริเวณย่อยด้วยกัน (six binding subsites) จากข้อมูลโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ hevamine [35] และ ไคตินเนส เอ จาก *S. marcescens* [20] พบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์ทั้งสองประกอบด้วยหกบริเวณคือ -4 -3 -2 -1 +1 และ +2 โดยที่บริเวณ -4 จะจับกับน้ำตาลที่ปลายอนรีควิซ ส่วนบริเวณ +2 จะจับกับน้ำตาลด้านรีควิซ ส่วนตำแหน่งตัด (cleavage site) คือพันธะ β 1,4 ไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างน้ำตาล -1 และ +1

3.6. การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโน Glu315 และ Asp392 ในการเร่งปฏิกิริยา

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *V. carchariae* ไคตินเนส เอ กับลำดับกรดอะมิโนของไคตินเนสจากแบคทีเรียหลาย ๆ ชนิด พบว่าโดเมนเร่งปฏิกิริยา (α/β)₈ TIM barrel มีลักษณะ conserved โดยมีกรดอะมิโนสองตัวคือ Glu315 และ Asp392 ที่พบในลำดับกรดอะมิโนของไคตินเนสทุกตัว และจากโครงสร้างสามมิติของไคตินเนส เอ ของ *S. marcescens* [20] พบว่ากรดอะมิโนสองตัวนี้อาจทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ทำการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน Glu315 ให้เป็น Met และ Gln ได้เป็นโปรตีนกลายพันธุ์ E315M และ E315Q และเปลี่ยน

Asp392 ให้เป็น Asn ได้เป็นโปรตีนกลายพันธุ์ D392N แล้วศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อการเร่งปฏิกิริยาการสลายดังแสดงในรูปที่ 3.6



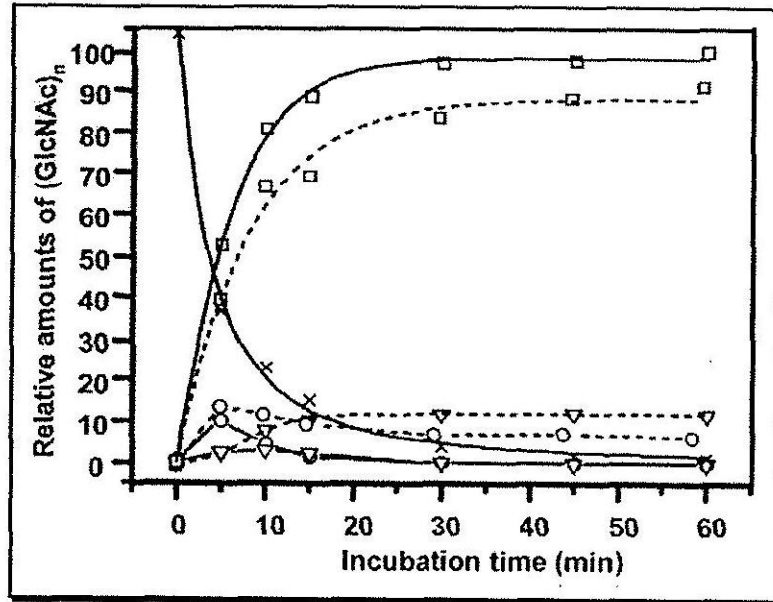
รูปที่ 3.6 การแสดงออกและการสลายสับสเตรทของไคตินเนส เอ กลายพันธุ์

รูป A คือ SDS/PAGE รูป B คือ Western blot analysis และรูป C คือ gel activity assay โดยใช้ไกลคอลลไคตินเป็นสับสเตรท (แหล่งที่มา: Suginta et al., FEBS J 2005, 3376-3386)

ผลการทดลองในรูป 3.6A แสดงความสามารถของ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ในการผลิตโปรตีนกลายพันธุ์เทียบกับโปรตีน wild-type พบว่าหลังจากผ่านขั้นตอนการทำ site-directed mutagenesis และการทำบริสุทธิ์แล้วแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีนกลายพันธุ์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกับโปรตีน wild-type ส่วนรูป 3.6B แสดงการเกิดปฏิกิริยา cross react ระหว่างโปรตีนกลายพันธุ์ D392N E315Q และ E315M กับ anti-chitinase polyclonal antibodies ที่ไม่แตกต่างกับการเกิด cross react ของโปรตีน wild-type ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของเอนไซม์ แต่จากรูปที่ 3.6C พบว่าแอกติวิตีในการสลายไกลคอลลไคตินของโปรตีน D392N ลดลงไปบางส่วน ส่วนแอกติวิตีของโปรตีน E315M และ E315Q หายไปอย่างสมบูรณ์ ผลการทดลองบ่งชี้ว่ากรดอะมิโน Glu315 เป็นกรดอะมิโนตัวเดียวที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา ส่วนกรดอะมิโน Asp392 ไม่มีส่วนโดยตรงต่อการเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท

3.7. การสังเคราะห์ไคโตโอลิโกแซคคารีไรต์ผ่านปฏิกิริยา transglycosylation

เมื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลายไคโตโอลิโกแซคคารีไรต์ที่ความเข้มข้นของสับสเตรทและอุณหภูมิในการเร่งปฏิกิริยาดำ ๆ เช่น 1 mM GlcNAc₄ ที่ 20° ซ นอกจากจะตรวจพบผลิตภัณฑ์หลักคือ GlcNAc₂ และผลิตภัณฑ์รองคือ GlcNAc แล้ว การวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS ยังสามารถตรวจพบมวลของน้ำตาลไคโตโอลิโกขนาดใหญ่ เช่น GlcNAc₃ และ GlcNAc₆ ซึ่งแสดงถึงการสังเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลใหญ่จากปฏิกิริยา transglycosylation จากน้ำตาลผลิตภัณฑ์ GlcNAc หรือ GlcNAc₂ กับสับสเตรท GINAc₄ ดังแสดงในรูปที่ 3.7



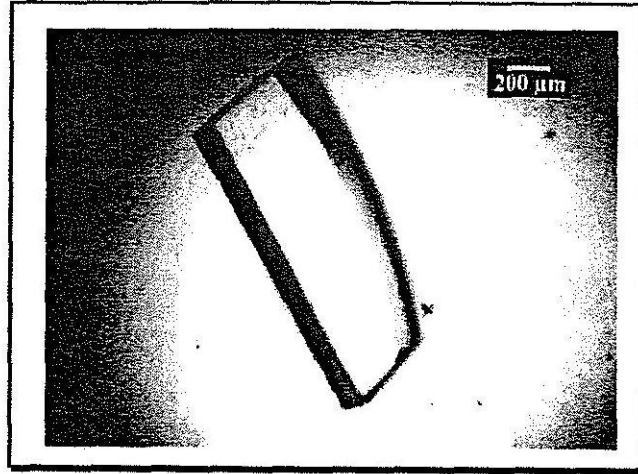
รูปที่ 3.7 ปฏิกิริยา transglycosylation ที่เกิดจากโคติเนส เอ

เอนไซม์ wild-type (เส้นทึบ) และโคติเนสกลายพันธุ์ (เส้นประ) สัญลัษณ์ที่แสดง (GlcNAc)₂ (□); (GlcNAc)₄ (×); (GlcNAc)₅ (▽); and (GlcNAc)₆ (○) (แหล่งที่มา: Suginta et al., FEBS J 2005, 3376-3386)

จากรูปที่ 3.7 พบว่าทั้งเอนไซม์ wild-type และเอนไซม์กลายพันธุ์สังเคราะห์น้ำตาล GlcNAc₆ จากน้ำตาล GlcNAc₄ ได้ในปริมาณสูงที่สุดเมื่อทำการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปริมาณของน้ำตาลทั้งสองจะลดลงอย่างรวดเร็วทั้งนี้เนื่องมาจากปฏิกิริยาการสลายให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลขนาดเล็ก ส่วนการสร้าง น้ำตาล GlcNAc₅ จะสูงขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาหลัง 5 นาทีแต่ปริมาณของน้ำตาล GlcNAc₅ จะคงที่แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสลาย GlcNAc₅ เกิดได้ช้ากว่าน้ำตาล GlcNAc₆ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสังเคราะห์น้ำตาล GlcNAc₅ และ GlcNAc₆ พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ D392N สามารถเกิดปฏิกิริยา transglycosylation ได้ดีกว่าเอนไซม์ wild-type

3.8. การศึกษาเบื้องต้นทางโครงสร้างของเอนไซม์โคติเนส เอ

ในการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์โคติเนส เอ ได้ทำการสร้างผลึกโปรตีนด้วยวิธี hanging drop vapor diffusion จากการเลือกใช้ตัว precipitant หลายชนิดและที่ความเข้มข้นและ pH ต่าง ๆ พบการเกิดผลึกโปรตีนที่มีลักษณะเป็น single crystal ขนาด 1100 x 400 x 100 μM³ (รูปที่ 3.8) ขึ้นเมื่อใช้ reservoir solution เป็น 10% (v/v) PEG400 ในสารละลายบัฟเฟอร์คือ 0.1 M sodium acetate, pH 4.6 และ 0.125 M CaCl₂



รูปที่ 3.8 ผลึกของรีคอมบิแนนท์ไคตินเนส เอ

การตกผลึกไคตินเนส เอ โดยวิธี hanging drop vapor diffusion ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี precipitant เป็น 10% (v/v) PEG400 และ 0.125 M CaCl_2 (แหล่งที่มา: Songsiririthigul et al., Acta Cryst. 2005, F61, 895-898)

เมื่อนำผลึกที่ได้มาผ่านรังสีเอ็กซ์แล้ว ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นจาก x-ray diffraction pattern โดยสมการ Fourier พบว่าผลึกโปรตีนมี space group เป็นแบบ tetragonal $P422$ มีค่าหน่วยเซลล์คือ $a = b = 127.64 \text{ \AA}$ และ $c = 171.42 \text{ \AA}$ ผลึกโปรตีนประกอบด้วยสองโมเลกุลต่อ asymmetric unit และมีค่า Matthews coefficient เป็น $2.74 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ และให้ค่า resolution สูงสุดเป็น 2.14 \AA ตารางที่ 3.3 แสดงค่าทางสถิติและข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จาก x-ray diffraction ของผลึกโปรตีนไคตินเนส

งานวิจัยขั้นต่อไปคือทำการแก้ปัญหา phase โดยวิธี Molecular Replacement โดยโครงสร้างที่ใช้เป็น structural model คือโครงสร้างสามมิติของอนไซม์ไคตินเนสเอ จากเชื้อ *S. marcescens* (PDB code 1CTN; 43% identity) โดยโปรแกรม Amore [1] จากการวิเคราะห์รายละเอียดพื้นฐานเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครงสร้างพบว่าผลึกไคตินเนสมี space group ที่ถูกต้องเป็น $P4122$ มีค่า amplitude correlation coefficient เป็น 32.4% มีค่า R factor เป็น 52.6% และผลึกโปรตีนมีการ pack ตัวเป็นอย่างดี ส่วนรายละเอียดของโครงสร้างสามมิติอยู่การวิเคราะห์ที่นอกเหนือจากงานวิจัยนี้

ตารางที่ 3.3 ค่าทางสถิติของ crystallographic data ของผลึกโปรตีนไลตินเนส เอ (แหล่งที่มา: Songsiririthigul et al., Acta Cryst 2005, F61, 895-898)

Diffraction data	
Space group	<i>P422</i>
Unit-cell lengths (Å)	<i>a = b = 127.64,</i>
Solvent content (%)	55.1
Total number of unique reflections collected	76752
Number of observed reflections	364202
Redundancy	4.75
Wavelength used (Å)	1.5418
Resolution range (Å)	54.16–2.14 (2.22–2.14)
Completeness (%)	97.2 (81.6)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	7.8 (24.3)
$\langle I/\sigma I \rangle$	5.4 (1.7)

$\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where I_i is the intensity for the i^{th} measurement of an equivalent reflection with indices hkl .

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีเนื้อหาหลักเกี่ยวข้องข้องกับการศึกษาหน้าที่และโครงสร้างพื้นฐานของเอนไซม์ไคตินเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* การศึกษาเริ่มต้นด้วยการใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 'mChiA' ขนาด 1.7 กิโลเบส โดยดีเอ็นเอนี้จะถอดรหัสให้โปรตีนไคตินเนส เอ ขนาด 63 กิโลดาลตัน ดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอคือพลาสมิด pBluescript KS II (-) ที่มีดีเอ็นเอตั้งต้น pchiA บรรจุอยู่เมื่อทำการโคลนยีน mChiA ที่ได้เข้าไปในพลาสมิด pQE60 แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE60-mChiA เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ M15 พบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้านสามารถผลิตโปรตีนเป้าหมายปริมาณมากเมื่อทำการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วย 0.5 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 5-8 ชั่วโมง โดยปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้คืออยู่ในช่วง 20-40 mg ต่อการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 1 ลิตร เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้มีกรดอะมิโนซิสทีนติดอยู่ที่ด้าน C-terminus จึงสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการใช้โครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะ (Ni²⁺ NTA agarose chromatography) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย SDS/PAGE พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์มีขนาด 63 กิโลดาลตัน และทำการยืนยันว่าโปรตีนบริสุทธิ์คือเอนไซม์ไคตินเนส โดยวิเคราะห์หามวลด้วย MALDI-TOF MS หรือ ESI MS และการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้วทำ peptide mass fingerprinting การศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยเทคนิค HPLC MS พบว่าไคตินเนส เอ มีลักษณะเป็นเอนโคไคตินเนสเนื่องจากสลายสายไคตินให้ผลิตผลเป็นไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ และผลิตผลสุดท้ายคือไคโตไบโอส (GlcNAc₂) เมื่อทำปฏิกิริยาการสลายที่เวลาสั้น ๆ พบว่าน้ำตาลผลิตผลที่ได้มีลักษณะเป็นบีต้าอะโนเมอร์ซึ่งยืนยันว่าไคตินเนสสลายสับสเตรทโดยกลไกแบบ 'retaining mechanism' การศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่าเอนไซม์มีความชอบที่สุดกับไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขนาดหกหน่วย การกลายพันธุ์กรดอะมิโนสองตัวที่บริเวณเร่งคือ Glu315 และ Asp392 พบว่าการเปลี่ยน Glu315 ให้เป็น Gln/Met ทำให้ได้โปรตีนกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถสลายไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ได้เลยแสดงว่ากรดอะมิโนตัวนี้มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา แต่พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ D392N (เมื่อกรดอะมิโน Asp392 ถูกเปลี่ยนเป็น Asn) สามารถเร่งปฏิกิริยา transglycosylation ได้ดีกว่าเอนไซม์ดั้งเดิม การศึกษาด้านโครงสร้างโดยใช้วิธีการตกผลึกโปรตีนแบบ hanging drop vapor diffusion method พบผลึกไคตินเนสเดี่ยวขนาด 1000 x 400 x 100 μM³ ในสถานะที่มี 10%(v/v) PEG400 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate, pH 4.6 และ 0.125 M CaCl₂ ที่อุณหภูมิ 16° ซ เมื่อนำผลึกโปรตีนมาผ่านรังสีเอ็กซ์แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลทาง crystallography เบื้องต้นพบว่าผลึกโปรตีนมี space group เป็นแบบ tetragonal P422 ประกอบด้วยสองโมเลกุลต่อ asymmetric unit และให้ค่า resolution สูงสุดเป็น 2.14 Å

บรรณานุกรม

1. Gooday, G.W. (1994) In C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312
2. Davis, B., and Eveleigh, D.E. (1984) In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.
3. Papavizas, C.G. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54
4. Cabib, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 59-101
5. Kuranda, M., and Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 19758-19767
6. Srivastava, A.K., Defago, G., and Boller, T. (1985) Secretion of chitinase by *Aphanocladium album*, a hyperparasite of wheat rust. *Experientia.* 41, 1612-1613
7. Sivan, A., and Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682
8. Jeuniaux C. (1966) Chitinases. *Methods Enzymol.* 8, 644-650
9. Okutani, K. (1977) Chitin digestion in the digestive tract of fish. *Proc. First Int. Confer. Chitin/Chitosan*, Boston MA (USA), April 11th-13th, 1977, 554-562
10. Okutani, K., Sawada, T., and Kimata, M. (1967) Studies of chitinolytic enzymes in aquatic animals - The chitinolytic enzyme present in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33, 952-955
11. Spindler-Barth, M. (1993) Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines. In Chitin Enzymology (Muzzarelli, R.A.A., ed.), European Chitin Society, Italy, 75-82
12. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., and Vogeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31
13. Pleban, S., Chernin, L., and Chet, I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett Appl. Microbiol.* 25, 284-288
14. de Jong, A.J., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., van Kammen, A., de Vries, S.C. (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4, 425-433
15. Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., and Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. A physical function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 266, 24260-24267

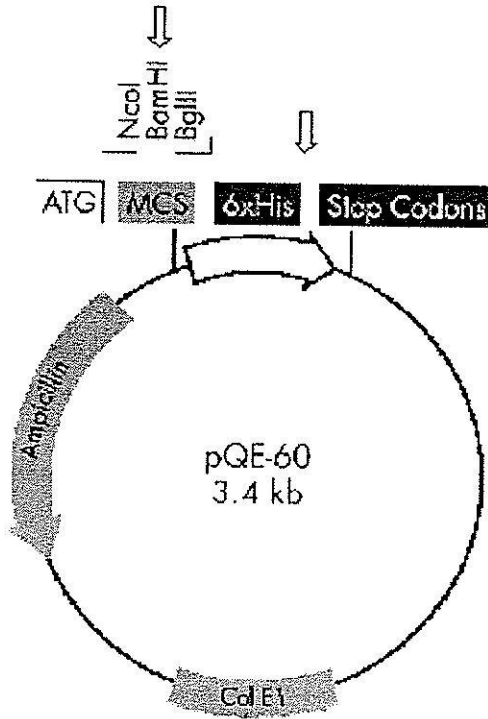
16. Montgomery, M.T., and Kirchman, D.L. (1993) Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 373-379
17. Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y.C., and Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.* 266, 2476-2486
18. Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzyki K., and Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* 172,4107-4022
19. Svityl, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. (1997) Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 408-413
20. Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., and Vorgias, C.E., 1994. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169-1180
21. Wang, S.H., Zheng, H.J., Dissanayake, S., Cheng, W.F., Tao, Z.H., Lin, S.Z., Piessens, W.F. (1997) Evaluation of recombinant chitinase and SXP1 antigens as antimicrofilarial vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 474-481
22. Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., and Harman, G.E. (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7860-7865
23. Carroad, P.A., and Tom, R.A. (1978) Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of microorganisms. *J. Food. Sci.* 43, 1158-1161
24. Cosio, I.G., Fisher, R.A., and Carroad, P.A. (1982) Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.* 47, 901-905
25. Suginta W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz,H., Estibero, P., Duncan, R.R., Svasti, J. and Fothergill-Gilmore LA. (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch Biochem Biophys.* 424, 171-180.
26. Lammeli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
27. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
28. Shevchenko, A., Chernushevic, I., Shevchenko, A., Wilm, M., Mann, M. (2002) "De novo" sequencing of peptides recovered from in-gel digested proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Mol Biotechnol.* 20, 107-118.

29. Pflugrath, J.W. (1999) The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55, 1718-1725.
30. Suginta, W., Robertson, P.A.W., Austin, B., Fry, S.C. and Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84.
31. Honda, Y., Kitaoka, M., Tokuyasu, K., Sasaki, C., Fukamizo, T., and Hayashi K (2003) Kinetic studies on the hydrolysis of N-acetylated and N-deacetylated derivatives of 4-methylumbelliferyl chitobioside by the family 18 chitinases ChiA and ChiB from *Serratia marcescens*. *J Biochem.* 13, 253–258.
32. Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K., and Robertus, J.D. (2001) Kinetic properties of Chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Biochemistry* 40, 2448–2454.
33. Bokma, E., Barends, T., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Dijkstra, B.W., and Beintema, J.J. (2000) Enzyme kinetics of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *FEBS Lett* 478, 119–122
34. Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Perrakis, A., Wilson, K.S., and Dijkstra, B.W. (1997) Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 7954–7959
35. Terwisscha van Scheltinga, A.C., Armand, S., Kalk, K.H., Isogai, A., Henrissat, B., and Dijkstra, B.W. (1995) Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry* 34, 15619–15623.

ภาคผนวก ก

แผนที่พลาสมิด

- พลาสมิด pQE60



ภาคผนวก ข

สารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ

1. Solutions for Preparing Resolving SDS-Polyacrylamide Gels

Solution components	Component volume (ml) per gel mole volume of		
	5 ml	10 ml	20 ml
12% H ₂ O	1.6	3.3	6.6
30% acrylamide mix	2.0	4.0	8.0
1.5 M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	5.0
10% SDS	0.05	0.1	0.2
10% ammonium persulphate	0.05	0.1	0.2
TEMED	0.002	0.004	0.008

2. Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volume (ml) per gel mole volume of	
	2 ml	5 ml
H ₂ O	1.4	3.4
30% acrylamide mix	0.33	0.83
1.0 M Tris (6.8)	0.25	0.63
10% SDS	0.02	0.05
10% ammonium persulfate	0.02	0.05
TEMED	0.002	0.005

3. Buffers for SDS-PAGE

SDS-gel loading buffer (3 x stock)

150 mM Tris.Cl (pH6.8)
300 mM dithiothreitol
6% SDS (electrophoresis grade)
0.3 % bromophenol blue
30% glycerol

Tris-Glycine electrophoresis buffer (5 x stock)

250 mM Tris.Cl (pH 8.3)
1.25 M glycine (electrophoresis grade) (pH 8.3)
0.5 % SDS

4. Staining solution with Coomassie Brilliant Blue for Protein

Dissolve 0.25 g of Coomassie Brilliant Blue R250 in 90 ml of methanol:H₂O (1:1v/v) and 10 ml of glacial acetic acid. Filter the solution through a Whatman No. 1 filter to remove any particulate matter.

5. Destaining Solution for Coomassie Stain

30% methanol
10% acetic acid
dH₂O is added to bring volume to 100 ml.

6. Bradford Reagent for Determination of Protein Concentration

The dye reagent is prepared by dissolving 0.01% Coomassie blue G-250 in a mixture of 85% (v/v) phosphoric acid, 95% (v/v) ethanol, and water in a ratio of 10:5:85 by vol.

ประวัติผู้วิจัย

Name Wipa Suginta

Affiliation School of Biochemistry, Institute of Science,
Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand
Tel: +66 44 22 4313; **E-mail** wipa@sut.ac.th

Degree Ph.D. (Biochemistry), University of Edinburgh, UK

M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand

B.Sc. (Biochemistry), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Current Position Associate Professor in Biochemistry

Fellowships/Awards (year 2000 - present)

- 2006 Suranaree University of Technology Award for “Outstanding Academic Performance in Science”
- 2005 “For Women in Science Fellowship” from L’OREAL (Thailand) / UNESCO.
- 2004 A General Travel Grant from the Biochemical Society for a Study Visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.
- 2003 A DAAD Fellowship for a Study Visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.

Research Interest

1. Structure and function of bacterial porins
2. Structure and function of chitinases from marine bacteria

Publication

Research Articles

1. Pantoom S, Songsiriritthigul C & Suginta W (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC-Biochemistry*, 9:2 (unofficial JIF2006 = 2.04).
2. Suginta W, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA - General Subjects*, 1770, 1151-1160. (JIF2005 = 2.418).

3. **Suginta W** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb. Tech.* 41, 212-220. (JIF2006 = 1.987)
4. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H & **Suginta W** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *Acta Cryst. Section F.* 61, 895-898. (Newly launched journal, journal impact factor has not been assigned)
5. **Suginta W**, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376-3386. (JIF2006 = 3.292)
6. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & **Suginta W** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* 384, 609-617. (JIF2005 = 4.224)
7. **Suginta W**, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180. (JIF2005 = 3.152)
8. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & **Suginta W** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem. J.* 377, 579-587. (JIF2005 = 4.224)
9. **Suginta W**, Karoulias N, Aitkin A & Ashley RH (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem. J.* 359, 55-64. (JIF2005 = 4.224)
10. **Suginta W**, Robertson PAW, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84. (JIF2005 = 2.127)
11. Svasti J, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S & Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In *Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
12. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for

- Oligosaccharide Synthesis. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
13. **Suginta W** & Svasti MRJ (1995) Purification and Properties of β -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *ScienceAsia* 21, 183-186.
 14. **Suginta W** & Svasti J (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
 15. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* 21, 293-303.

Recent Presentation in Scientific Meetings

1. **Suginta W** & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P14, *Invited oral presentation*.
2. **Suginta W**. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P47. *Poster presentation*.
3. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & **Suginta W**. The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P53. *Poster presentation*.
4. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P27. *Poster presentation*.
5. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The effect of the N-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P61. *Poster presentation*.

6. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P19. *Oral presentation*.
7. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC*.
8. **Suginta W**. On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15th, 2006. *Invited oral presentation*.
9. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation*.
10. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A & **Suginta W** Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P335. *Poster presentation*.
11. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23th-24th, 2005. *Invited oral presentation*.
12. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & **Suginta W** Porin from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. In 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July 2nd-7th, 2005. *FEBS J. Vol. 272, Supp. 1, P389. Poster presentation*.
13. Songsiriritthigul C, Robinson RC, Yuvaniyama J & **Suginta W** Expression, purification, and preliminary structural analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P164. *Poster presentation*.
14. Siritapetawee J & **Suginta W** Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P5. *Poster presentation*.
15. **Suginta W**, Svasti J & Prinz H Enzymatic properties of a family 18 chitinase a from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI mass spectrometry, Joint Senior Research Scholar Meeting:

- Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22th-23th, 2003, *Invited oral presentation*.
16. Siritapetawee J, Ashley RH, Prinz H, Samosornsuk W & **Suginta W** Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Invited oral Presentation*.
 17. **Suginta W** C-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Oral presentation*.
 18. Sun Q, McDonald A, **Suginta W** & Ashley RH (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans.* A112. *Poster Presentation*.
 19. **Suginta W** & Ashley RH (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference)*, P57. *Poster presentation*.
 20. **Suginta W**, Estibeiro P, Rigden DJ & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J.* P417A. *Poster presentation*.
-