



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทและความสำคัญของ Tandem Repeats
ภายในยีน *leuA* ของเชื้อวัณโรค

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิมล จันทร์แจ่ม
รองศาสตราจารย์ นพ.ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์

31 มีนาคม 2548

สัญญาเลขที่ MRG4580031

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทและความสำคัญของ Tandem Repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อวัณโรค

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิมล จันทน์แจ่ม
รองศาสตราจารย์ นพ.ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาแห่งชาติ
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4580031

ชื่อโครงการ: การศึกษาบทบาทและความสำคัญของ Tandem Repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อวัณโรค

ชื่อนักวิจัย: วิมล จันทร์แจ่ม¹ และ ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก
บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6
พญาไท กรุงเทพฯ 10400

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ในการศึกษาบทบาทและความสำคัญของส่วน tandem repeats ในยีน *leuA* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS) ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ดังกล่าว ที่เตรียมจากยีน *leuA* ปกติ และที่เตรียมจากยีน *leuA* ที่ได้ตัดส่วน tandem repeat ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบส จำนวน 2 ชุด ออกโดยวิธี mutagenic PCR โดยยีน *leuA* ทั้ง 2 แบบได้ถูกเชื่อมต่อกับ expression vector pET15b และทำการสร้างเอนไซม์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL 21(DE3) ซึ่งจากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 แบบถูกสร้างได้ดี เมื่อใช้สาร isopropylthio- β -galactoside ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการกระตุ้นการทำงานของยีน และใช้อุณหภูมิ 25^o ซ เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่ายีน *leuA* ที่ถูกตัดส่วน tandem repeats ออก สามารถกำหนดการสร้าง α -IPMS ที่มี activity เทียบเท่าเอนไซม์ที่สร้างจากยีนปกติ โดยที่ mutated α -IPMS มีคุณสมบัติพื้นฐานใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ความเสถียรในสภาพพีเอชต่างๆ และจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์ สำหรับค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์พบว่า mutated α -IPMS มีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นผลมาจากการตัดส่วนของ tandem repeats ของยีน *leuA* ออก ผลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า tandem repeat ดังกล่าว อาจไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *leuA* ในแง่การแสดงออกของยีน และคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ α -IPMS

คำหลัก: tandem repeats, alpha-isopropylmalate synthase, *leuA*, *Mycobacterium tuberculosis*

Abstract

Project code: MRG4580031

Project Title: Investigation for the Role and Significance of Tandem Repeats within
Mycobacterium tuberculosis leuA Gene

Investigator: Wimon Chanchaem ^a and Prasit Palittapongarnpi

^a Department of Biology , Faculty of Science, Ramkhamhaeng
University , Huamark, Bangkok, Bangkok 10240, Thailand.

^b Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol
University, RamaVI Rd, Phayathai , Bangkok 10400, Thailand.

E-mail Address: wimole@hotmail.com

Project Period: 2 years

In order to investigate for the role and significance of tandem repeats within *Mycobacterium tuberculosis leuA* gene encoding alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS), we compared the properties of native α -IPMS and mutated α -IPMS of which the 2 copies of 57 bp repeats had been deleted. By using mutagenic PCR procedure , we successfully constructed a recombinant plasmid of pET15b expression vector carrying the mutated gene. Optimum expression conditions were studied and properties of gene products were compared. Mutated gene was optimally amplified at 64°C annealing temperature and well expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) at 25°C for 3-6 hrs using isopropylthio - β -galactoside at the final concentration of 0.5 mM as inducer. Properties of both native and mutated enzymes were compared. The results showed that with deletion of the 2 copies of 57 bp tandem repeats, the mutated *leuA* can well expressed to a functional mutated α -IPMS. The basic properties of mutated α -IPMS was similar to the native α -IPMS. Mutated α -IPMS was smaller, corresponding to the deleted 2 copies of 19 amino acids repeats and the native form of the enzyme was also dimer. The optimal temperature and optimal pH for enzyme activity was between 30°-50° C and 7.5 respectively. The stability of mutated α -IPMS also similar to the native α -IPMS. From this study, significant differences was not observed between the two types of enzyme. These results showed that the 2 copies of 57 bp tandem repeats may have no relation to *leuA* expression and α -IPMS basic properties.

Keywords: tandem repeats, alpha-isopropylmalate synthase, *leuA*, *Mycobacterium tuberculosis*

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาบทบาทและความสำคัญของ Tandem Repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อวัณโรค
- (ภาษาอังกฤษ) Investigation for the Role and Significance of Tandem Repeats within *Mycobacterium tuberculosis leuA* Gene

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

นางสาววิมล จันทร์แจ่ม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
แขวงหัวหมาก เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240
โทรศัพท์ 02-3190801-3 ต่อ 135, 02-3194358
โทรสาร 02-3194358 e-mail : wimolc@hotmail.com

3. สาขาวิชาที่ทำกรวิจัย อนุชีววิทยาของแบคทีเรีย, แบคทีเรียทางการแพทย์

4. งบประมาณทั้งโครงการ 480,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วนเพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

- ☒ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น
- ☐ เสนอต่อ
- ชื่อโครงการที่เสนอ
- กำหนดทราบผล (หรือสถานภาพที่ทราบ)

7. ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

จากการศึกษาคุณสมบัติ polymorphisms ของโครโมโซมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv พบว่าที่ปลาย 3' ของยีน *leuA* มี Repeated sequence ซึ่งมีความยาว 57 คู่เบสเรียงติดกัน 2 ชุด โดยอยู่ในส่วน coding region เมื่อศึกษาเชื้อนี้ที่เป็นสายพันธุ์จากผู้ป่วย พบลักษณะ polymorphisms ของเอ็นไซม์อย่างสอดคล้องกับลักษณะ polymorphisms ของยีน *leuA* ด้วยทำให้เป็นที่น่าสนใจว่า tandem repeat มีบทบาท หน้าที่ และความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้หรือไม่อย่างไร

แต่เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับเอ็นไซม์ α -IPMS ซึ่งเป็นผลผลิตจากยีนนี้ ของเชื้อ *M. tuberculosis* รวมทั้งโครงสร้าง 3 มิติ ของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ยังไม่มีผู้ศึกษาไว้ ทำให้คาดคะเนผลของ Repeated amino acid ที่มีต่อการทำงานของเอ็นไซม์ได้ยาก อีกทั้งยังไม่มีผู้ใดทราบบทบาทและความสำคัญของ Repeated sequence ประเภทนี้ที่มีต่อเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งในแง่ของการดำรงชีวิตและการก่อโรค

8. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาบทบาทและความสำคัญของ tandem repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ต่อคุณสมบัติของเอ็นไซม์ alpha-isopropylmalate synthase

9. ระเบียบวิธีวิจัย

1. สร้างพลาสมิดที่มียีน *M.tuberculosis* H37Rv *leuA* ที่นำ repeated sequence ซึ่งยาว 57 คู่เบสออกโดยใช้เทคนิค Mutagenic PCR procedure
2. เตรียมเอ็นไซม์ α -IPMS และ mutated α -IPMS บริสุทธิ์ จาก *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)
3. ศึกษาเปรียบเทียบ mutated α -IPMS กับ native α -IPMS โดยทำการศึกษาแบ่งเป็น 3 ส่วน
 - 3.1 การศึกษา enzymatic properties ต่างๆ
 - 3.2 หาค่ามวลโมเลกุล (MW) ของเอ็นไซม์และหน่วยย่อยของเอ็นไซม์โดยใช้เทคนิค Gel Filtration Chromatography และ Polyacrylamide Gel Electrophoresis ทั้งแบบ Non-denaturing และแบบ SDS-PAGE
 - 3.3 ศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของเอ็นไซม์ โดยวิธี x-Ray Crystallography

10. จำนวนโครงการที่ผู้สมัครกำลังดำเนินการอยู่ โดยขอให้ระบุระยะเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดของแต่ละโครงการ แหล่งทุน และงบประมาณสนับสนุนที่ได้รับ เวลาที่ใช้ทำโครงการเป็นกี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์ ทั้งในฐานะหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมโครงการของแต่ละโครงการที่กำลังดำเนินการอยู่

ชื่อโครงการ -

ระยะเวลาโครงการ ปี ตั้งแต่ ถึง
แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน

งบประมาณที่ได้รับ

สถานะผู้สมัคร ☐ หัวหน้าโครงการ
☐ ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้กี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์ -

บทนำ

เอนไซม์ α -isopropylmalate synthase (α -IPMS) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาแรกในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน Leucine ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อว่า *leu4* (1-3)

จากการศึกษาคุณสมบัติ polymorphisms ของโครโมโซมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv พบว่าที่ปลายด้าน 3' ของยีน *leu4* มี repeated sequence ซึ่งมีความยาว 57 คู่เบส เรียงติดกัน 2 ชุด โดยอยู่ในส่วน coding region ของยีนดังกล่าว (4) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ตำแหน่งของโลคัสนี้ซึ่งมีชื่อว่า VNTR4155(5) ของโครโมโซม *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วยมีลักษณะของ polymorphisms อีกด้วย (4)

บนส่วนของ tandem repeats ที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv นี้ ไม่พบ stop codon และมีความยาวของ repeats ในลักษณะ “multiples of 3 bp” ดังนั้นการเกิด insertion หรือ deletion ของโครโมโซมส่วนนี้อาจไม่มีผลในการจัดขบวนการ translation ของเซลล์ แต่มีผลกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ α -IPMS ที่อาจเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปตามการเกิด insertion หรือ deletion ของ repeated sequence ดังกล่าว นอกจากนี้จากการศึกษาลำดับเบสของยีนของ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วยที่แสดงลักษณะ polymorphisms ของยีนส่วนนี้ พบว่าลักษณะดังกล่าวเป็นผลมาจากการมีจำนวนชุดที่ต่างกันของ tandem repeat ยีนดังกล่าวสามารถทำงานได้ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นมีลักษณะ polymorphics สอดคล้องกับลักษณะ polymorphisms ของยีน (6) โดยที่ยังคงมีคุณสมบัติทั่วไปและการทำงานเช่นเดียวกับ α -IPMS ของเชื้ออื่นๆ

แม้บนโครโมโซมของ *M. tuberculosis* ถูกพบว่ามี VNTR (variable numbers of tandem repeats) อยู่หลายชนิด และบางชนิดถูกนำไปใช้ช่วยในการวิเคราะห์เชื้อได้อย่างกว้างขวาง (5, 7-15) ก็ตาม แต่การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงบทบาทและความสำคัญของ repeated sequence ดังกล่าวที่มีต่อ *M. tuberculosis* ยังคงมีน้อยมาก (16) และเนื่องจากการที่ยังไม่มีผู้ศึกษาโครงสร้าง 3 มิติ (three-dimensional structure) ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ อันได้แก่ isopropylmalate/homocitrate/citrate synthase อย่างจริงจัง จึงทำให้การคาดคะเนผลของ repeated amino acid ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ α -IPMS ยังไม่อาจทำได้ นอกจากนี้ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ชนิดนี้ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. มีน้อยมาก อีกทั้งบทบาทและหน้าที่ของ VNTR ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ α -IPMS ของจุลินทรีย์ 23 ชนิด จากกลุ่มของ Eubacteria, Archaeobacteria และ Fungi พบว่ามีเพียง α -IPMS ของ *M. tuberculosis* เท่านั้น ที่มี repeated sequence ของกรดอะมิโน (6) จึงเป็นที่น่าสนใจว่า repeated amino acid sequence อาจไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ

การทำงานตามปกติของเอนไซม์ แต่มีบทบาทสำคัญอย่างอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตและการก่อโรคของเชื้อดังกล่าว เช่นการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและการหลบหลีกจากกลไกทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (17) เป็นต้น

นอกจากนี้ Leucine biosynthesis ของเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ยังมีผู้สนใจนำมาใช้เป็นเป้าหมายสำหรับการทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ในภาวะ attenuation เพื่อใช้ในการชักนำให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าได้ผลดีเทียบเท่าการใช้ BCG (18) การวิจัยดังกล่าวแสดงถึงการใช้ leucine auxotroph ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคซึ่งอาจเป็นไปได้ในอนาคต

ดังนั้นผู้วิจัยมีความเห็นว่าการศึกษาดังกล่าว และความสำคัญ tandem repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* จะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีผู้ศึกษา ได้แก่ ข้อมูลความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ α -IPMS ของเชื้อ *M. tuberculosis* เอง ทั้งในแง่ของคุณสมบัติทั่วไป โครงสร้าง 3 มิติ และ การทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้การทราบถึงบทบาทและความสำคัญของ tandem repeats ที่มีต่อเอนไซม์ α -IPMS อาจนำไปสู่การค้นพบบทบาทและหน้าที่ที่แน่ชัดของ VNTR ในโครโมโซมของจุลชีพ และหาก tandem repeats นี้เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ α -IPMS หรือมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตและการก่อโรคของเชื้อ อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาการป้องกันและการรักษาวัณโรคด้วยแนวทางใหม่ๆต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาบทบาทและความสำคัญของ tandem repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ α -isopropylmalate synthase

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

การสังเคราะห์กรดอะมิโนในกลุ่ม branched chain amino acid ซึ่งได้แก่ leucine, isoleucine และ valine มีผู้สนใจและศึกษาอย่างกว้างขวาง ทั้งในสิ่งมีชีวิตพวก Eukaryotes และ Prokaryotes หลายชนิด เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั่วไป การสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่อาศัย Isopropylmalate (IPM) pathway ซึ่งปฏิกิริยาแรกเป็น committed reaction มีเอนไซม์ α -Isopropylmalate synthase (α -IPMS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (1-3)

เอนไซม์ α -IPMS มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลชีพหลายชนิด ถูกกำหนดการสร้างโดยยีน *leuA* เป็นเอนไซม์ชนิด allosteric enzyme ซึ่งพบทั้งในแบคทีเรีย พืช และ พืช (1-3, 19-22) การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้มีมาตั้งแต่ปี ค.ศ 1956 โดยเน้นที่วิถีการสังเคราะห์ leucine ใน IPM pathway (23) หลังจากนั้น ได้มีผู้รายงานการศึกษา leucine operon ส่วนต่างๆ ได้แก่ operators, structural genes รวมไปถึงการแสดงออก

ของ operon ดังกล่าว โดยส่วนใหญ่ทำการศึกษาในเชื้อ *Salmonella typhimurium* (19, 23-27) แต่ไม่มีรายงานการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้ใน *M. tuberculosis*

ในการศึกษาคุณสมบัติ polymorphisms ของโครโมโซมเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ได้มีรายงานการพบ repeated sequence ความยาว 57 คู่เบส เรียงติดกัน จำนวน 2 ชุด ที่ด้าน 3' ของยีน *leuA* โดยที่ tandem repeats นี้อยู่ในส่วนของ coding region ของยีนดังกล่าว จากการศึกษาโครโมโซมของ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วย พบลักษณะ polymorphisms ที่ส่วนของ *leuA* gene อย่างชัดเจน (4) และเมื่อทำการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนที่แสดง polymorphisms พบว่าลักษณะดังกล่าวเป็นผลมาจากการมีจำนวนชุดที่ต่างกันของ repeated sequence ซึ่งมีความยาว 57 คู่เบส ข้างต้น (6)

นอกจากนั้นได้มีรายงานว่าทั้ง *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ซึ่งมี repeated sequence จำนวน 3 ชุด และ 6 ชุด บนยีน *leuA* สามารถสร้างเอนไซม์ α -IPMS ได้ โดยที่เอนไซม์ที่ได้มีลักษณะ polymorphisms สอดคล้องกับลักษณะของยีน (6) ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานการพบ polymorphisms ของยีน *leuA* ในเชื้ออื่น รายงานข้างต้นนี้เป็นการสนับสนุนว่ายีน *leuA* ของ *M. tuberculosis* ที่มี repeated sequences สามารถทำงานได้จริง อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ศึกษาเอนไซม์ α -IPMS ในเชื้อนี้

การค้นพบ VNTR ชนิดต่างๆ บนโครโมโซมของ *M. tuberculosis* ได้มีผู้รายงานไว้ (5, 7) และยังมีรายงานการใช้ VNTR ในการวิเคราะห์เชื้อในกลุ่ม Mycobacterium อีกด้วย (7-15) อย่างไรก็ตามบทบาทและหน้าที่ของ VNTR ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาที่มุ่งเน้นในเรื่องนี้ยังมีน้อยมาก

ในแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ได้มีผู้รายงานว่า VNTR มักอยู่ในยีนที่กำหนดการสร้าง surface exposed proteins ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดพยาธิสภาพของเชือนั้นๆ คุณสมบัติ polymorphisms ของโปรตีนอาจมีประโยชน์ในการช่วยให้เชื้อก่อโรคสามารถปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่อาศัย รวมทั้งอาจช่วยในการหลบหลีกจากการทำลายของภูมิคุ้มกันจากโฮสต์ (17)

สำหรับ VNTR-containing *leuA* gene ของ *M. tuberculosis* นี้เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์สำหรับเมตาโบลิซึมของเซลล์ ซึ่งไม่ได้มีการทำงานสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยตรง จึงอาจเป็นไปได้ว่า VNTR ดังกล่าวอาจมีบทบาทหรือความสำคัญอื่นๆ ต่อเชื้อนี้ทั้งในแง่ของการดำรงชีวิตและการก่อโรคที่รุนแรงในมนุษย์

และสืบเนื่องจากการที่ *M. tuberculosis* ยังคงเป็นสาเหตุสำคัญของการตายในประชากรโลก การป้องกันโรควัณโรคโดยใช้วัคซีน BCG แม้จะไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากและใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ประสิทธิภาพของการป้องกันโรคของวัคซีนชนิดนี้ยังคงมีความผันแปรอยู่มาก (28, 29) การคิดค้นหรือพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคที่มีคุณสมบัติดีขึ้น จึงยังคงเป็นที่ต้องการและมีความสำคัญต่อสังคมอย่างมาก เช่น การพัฒนา mutant สายพันธุ์ใหม่ๆ ของ Mycobacteria ที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้โฮสต์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันในระดับที่สูงพอ มีประสิทธิภาพดี และสามารถป้องกันโรคได้ในระยะยาว

ได้มีผู้รายงานการใช้ leucine biosynthetic pathway เป็นเป้าหมายในการทำให้เชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex กลายเป็นเชื้อที่อ่อนกำลังและไม่สามารถก่อโรคได้ เช่น การใช้เทคนิค transposon mutagenesis ในการสร้าง BCG leucine auxotroph ที่มีบางส่วนของยีน *leuD* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ α -IPM isomerase ถูกทำลายไป ทำให้เชื่อดังกล่าวอยู่ในภาวะ attenuation เมื่อทดสอบในหนู และไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ macrophages (30, 31)

จากรายงานของ Hondalus และคณะในปี ค.ศ 2000 แสดงให้เห็นว่า leucine auxotroph ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิค allelic exchange โดยแทนที่ยีน *leuD* ด้วย mutant copy ที่มีส่วนของยีนนี้หายไป 359 คู่เบส อยู่ในภาวะ attenuation เมื่อทดสอบในหนู และทำให้หนูมีอัตราการรอดตายจากการรับเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ดีเทียบเท่ากับการใช้วัคซีน BCG (18) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้ leucine auxotroph ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ α -isopropylmalate synthase (α -IPMS) ซึ่งกำหนดโดยยีน *leuA* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37 Rv โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่สร้างโดยยีน *leuA* ปกติ และเอนไซม์ที่สร้างโดยยีน *leuA* ที่ดัดส่วน repeated sequence ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบสจำนวน 2 ชุดออกแล้วโดยเรียกว่า mutated enzyme (สร้างจาก mutated gene) ระเบียบวิธีวิจัยและรายละเอียดมีดังนี้

1. การสร้างพลาสมิดที่มี mutated *leuA* gene ประกอบด้วย การทำ mutation โดยนำ repeated sequence ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบส จำนวน 2 ชุดออกโดยใช้เทคนิค Mutagenic PCR procedure

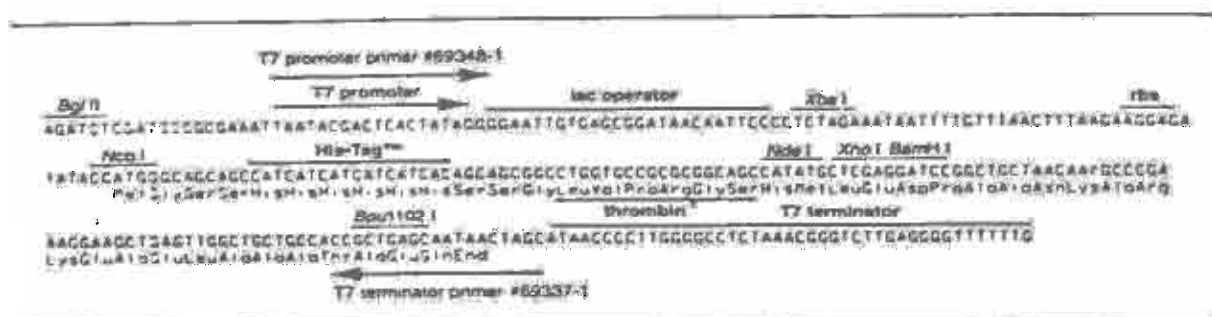
2. เตรียมเอนไซม์ α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติ (native α -IPMS) และ mutated *leuA* gene

3. ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของ mutated α -IPMS กับ native α -IPMS

1. สายพันธุ์แบคทีเรียและชนิดของพลาสมิด

แบคทีเรียที่ทำการศึกษาในครั้งมีคือ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37 Rv ซึ่งใช้เป็นแหล่งของยีน *leuA* สำหรับการผลิตเอนไซม์ α -isopropylmalate synthase (α -IPMS) และใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (BRL) เป็นโฮสต์สำหรับขั้นตอนการทำ cloning ในส่วนของ protein expression ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (Novagen) และใช้พลาสมิด pET15b (Novagen) เป็น cloning vector และ expression vector ดังแสดงในรูปที่ 1

pET-15b



รูปที่ 1 แสดง cloning vector (pET15b) ที่ใช้ในการศึกษา

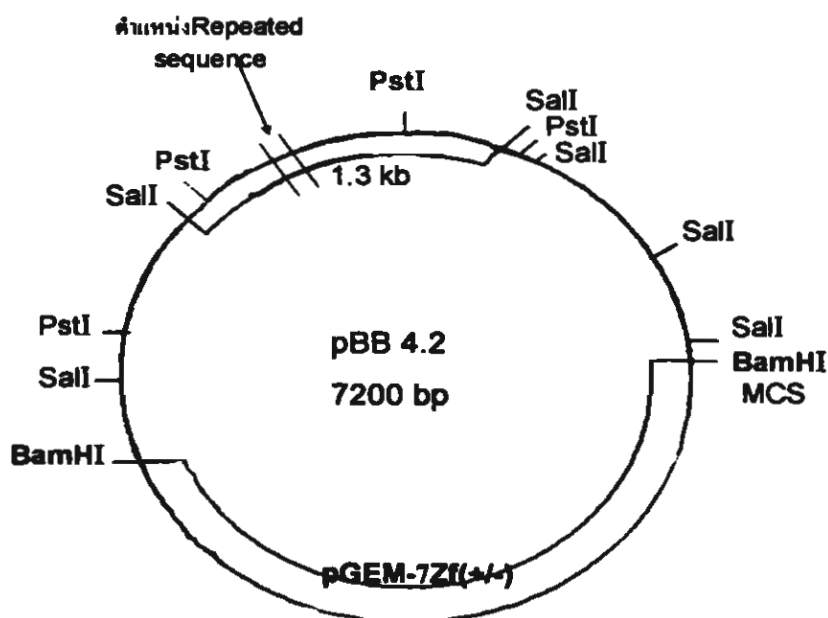
2. การสร้าง recombinant plasmid ที่มี mutated *leuA* gene

2.1 การเตรียม mutated *leuA* gene

2.1.1 การออกแบบ Primer

ใช้ข้อมูล *leuA* gene sequence ในการออกแบบ Primers จำนวน 3 คู่ โดย 2 คู่ ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *leuA* ที่อยู่หน้าและหลัง tandem repeat ตามลำดับ ส่วนคู่ที่ 3 ใช้ในการเพิ่มจำนวน mutated gene จากการนำชิ้นส่วนของ gene 2 ส่วนที่เพิ่มจำนวนได้แล้วมาต่อกัน

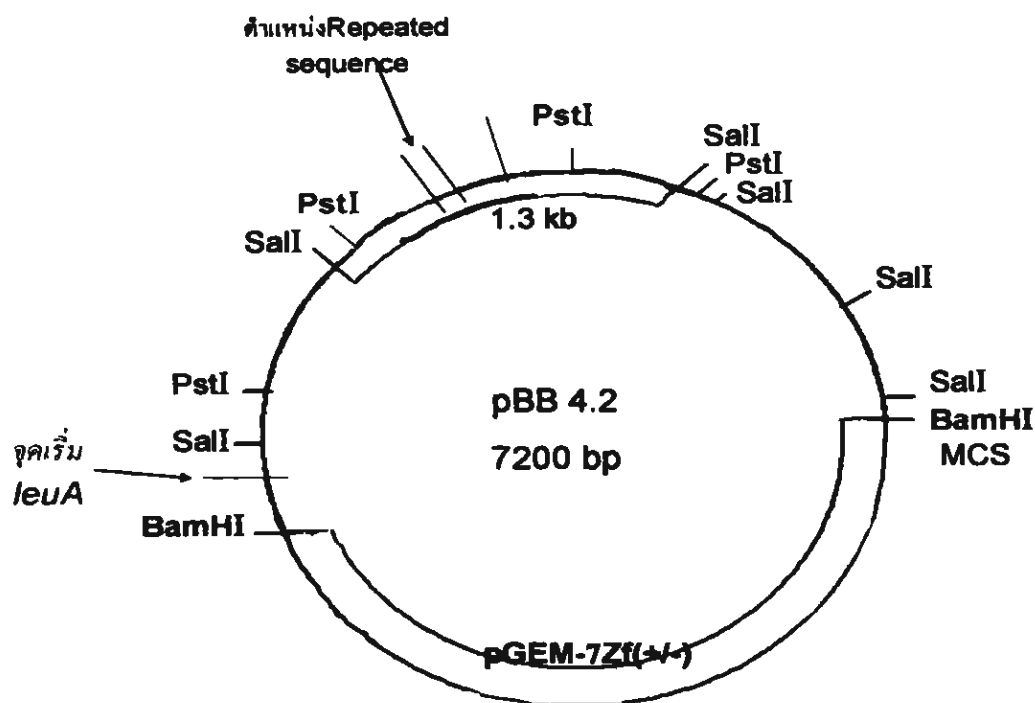
ในการออกแบบ Primer จะทำการออกแบบให้ได้ผลผลิตส่วนหน้าของ tandem repeat มีปลาย 3' เป็นเบสคู่สมกับส่วนหลังของ tandem repeat เป็นความยาว 12 คู่เบส จากนั้นทำ PCR รอบที่สอง โดยใช้ผลผลิตจากการเพิ่ม DNA ในรอบแรกที่ทำมาทำให้บริสุทธิ์แล้วและถูก anneal เข้าด้วยกันเป็น template ดังรูปที่ 2 ทั้งนี้ Primer คู่ที่ 3 ได้ออกแบบให้มี cloning site (*NdeI*, *BamHI*) เพื่อใช้ในการทำ cloning ต่อไป



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของ Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนส่วนของยีน *leuA* เพื่อใช้ในการศึกษา

2.1.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ *leuA* gene ส่วนที่อยู่หน้าและหลัง tandem repeat

ใช้เทคนิค PCR ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน 2 ส่วนจาก template ซึ่งเป็น recombinant plasmid ที่ประกอบด้วยชิ้นส่วนของ chromosomal DNA ของแบคทีเรีย *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ความยาวประมาณ 4.2 Kb ซึ่งมี complete *leuA* gene อยู่ภายใน ต่อเข้ากับ cloning vector pGEM-7zf (+/-) เรียก pBB4.2 (4) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงพลาสมิด pBB4.2 ซึ่งมี complete *leuA* gene อยู่ภายในส่วนของโครโมโซมจากเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งยาว 4.2 Kb

ทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะและมีปริมาณมากพอ ทำการตรวจสอบผลผลิตจาก PCR โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose เป็น 1% หรือ 1.5% ใน 0.5 M Tris Boric EDTA buffer (TBE) ขึ้นกับขนาดของ PCR product

2.1.3 การต่อชิ้นส่วนที่ 1 (ส่วนหน้า tandem repeat) และชิ้นส่วนที่ 2 (ส่วนหลัง tandem repeat) เข้าด้วยกัน และการเพิ่มจำนวน mutated gene

ในการต่อชิ้นส่วนที่ 1 และ 2 ของ *leu4* gene จะต้องทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ชิ้นส่วนทั้งสองต่อเข้าด้วยกันได้อย่างดีก่อนนำไปใช้เป็น template เพื่อเพิ่มจำนวน mutated gene ดังกล่าวให้ได้ปริมาณมาก สำหรับใช้ในการตัดต่อเข้ากับ cloning vector การต่อชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวจะต้องทำ annealing ในหลอดทดลอง ก่อนทำ PCR และปรับหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวน mutated gene ด้วย

2.2 การเชื่อมต่อ mutated gene เข้ากับเวกเตอร์

นำ mutated gene fragment ที่เพิ่มจำนวนได้แล้ว มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen) หาความเข้มข้นด้วยวิธี Spectrophotometry (260 nm) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 0.8% low melting agarose ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตัดแยกส่วนที่มี DNA ที่ต้องการมาทำการสกัดชิ้นส่วน DNA ออกโดยใช้ gel extraction kit (Qiagen) หลังจากหาความเข้มข้นของ mutated gene fragment ที่เตรียมได้ นำมาต่อเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET15b ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ชุดเดียวกัน โดยใช้ molar ratio ที่เหมาะสม ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำ transformation เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งเตรียมเป็น competent cell จากนั้นเพาะเลี้ยงบน L agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

2.3 การคัดเลือก clone ที่มี recombinant plasmid ที่ต้องการ

ทำการคัดเลือก clone ที่มี recombinant plasmid ที่ต้องการ ซึ่งมี insert (mutated gene) 2 วิธีดังนี้

2.3.1 วิธี restriction analysis

สกัดแยก recombinant plasmid ออกจากโคลนีโดยใช้วิธี alkaline lysis method จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *NdeI* โดยใช้ปริมาณ DNA 3 ไมโครกรัม อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นตรวจสอบผลโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis

2.3.2 วิธี PCR amplification โดยใช้ colony extract

นำโคลนีที่คาดว่าจะมี recombinant plasmid ซึ่งต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 loop มาทำให้เป็น suspension ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้ละลายและปั่นให้เซลล์แตกด้วย vortex mixer เป็นเวลา 3-5 นาที ปั่นเก็บส่วนใส โดยใช้เครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปใช้เป็น template ในการทำ PCR โดยใช้ primer คู่ที่ 3 และสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ปรับหาไว้แล้ว

3. การเตรียมเอนไซม์ α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติและยีนที่เป็น mutated *leuA* gene

3.1 การเตรียม α -IPMS จากยีนปกติ

นำ recombinant plasmid ซึ่งมียีน *leuA* ปกติ (pLEU151) (6) มาทำ transformation เข้าสู่โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ปริมาณมาก โดยใช้ LB broth ที่ผสมยาแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. และใช้ isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นสาร inducer ทำการผลิตเอนไซม์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

นำ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ซึ่งมี recombinant plasmid pLEU151 มาเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่มียาแอมพิซิลิน ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และหมุนเหวี่ยงเพื่อเพิ่มอากาศด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เมื่อเชื้อเจริญจนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5-0.6 เติมน้ำ IPTG ให้มีความเข้มข้น สุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำไป incubate ค่อยู่ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 3-6 ชม. จากนั้นปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย 50 mM Tris HCL buffer pH 7.5 นำเซลล์เก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.2 การเตรียม α -IPMS จาก mutated *leuA* gene

นำ recombinant plasmid จาก clone ซึ่งตรวจสอบแล้วว่า insert ที่ถูกต้อง มาทำ transformation เข้าสู่โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) จากนั้นดำเนินการทำนองเดียวกับการผลิตเอนไซม์จากยีนปกติ โดยจะต้องทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมของการทำ protein expression ด้วย ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG, เวลา และการหมุนเหวี่ยง เพื่อเพิ่มอากาศขณะสร้างเอนไซม์

4. การสกัดแยกและการเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์

4.1 การเตรียม crude extract

นำตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ มาทำให้ละลายและทำให้เป็น suspension ใน sonication buffer โดยใช้อัตราส่วน sonication buffer 10 มล. : cell culture 300 มล. นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator โดยแบ่งเป็น aliquot ที่เหมาะสม จากนั้นปั่นเก็บส่วนใสด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10000 g เป็นเวลา 20 นาที จะได้ crude extract เพื่อใช้ในการแยกเอนไซม์บริสุทธิ์ต่อไป

4.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography (His-tagged protein purification system)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ทำโดยใช้ TALON spin column (CLONTECH Laboratories) โดยนำตัวอย่างซึ่งเป็น crude extract 0.6-1 มล. ใส่ลงใน column ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที จากนั้นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วนำไป เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที นำไป centrifuge ที่ 700 g เป็นเวลา 2 นาที ที่ส่วนที่ออกจาก column จากนั้นทำการล้าง column 8-10 ครั้งด้วย washing buffer 1 มล. ก่อนการ elute ด้วย elution buffer 400-600 ไมโครลิตร

5. การตรวจหา enzyme activity

การหา enzyme activity เป็นแบบ end point assay โดยเป็นการตรวจหา coenzymeA จากปฏิกิริยาด้วยการใช้ DTNB [5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)]

Assay mixture ประกอบด้วย

Tris-HCl buffer pH 8.5	50 ไมโครโมล
KCl	20 ไมโครโมล
acetylCoA	2 ไมโครโมล
α - ketoisovalerate	0.5 ไมโครโมล

การหา enzyme activity ทำโดยเติมตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน assay mixture ที่ได้ทำ prewarmed ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จากนั้น incubate เป็นเวลา 2-10 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย absolute ethanol 0.75 มล. แล้วเติมสารละลาย DTNB ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร เทียบหา unit ของ enzyme activity โดยใช้กราฟมาตรฐานของ coenzymeA

6. การหาความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง

การหาความเข้มข้นของโปรตีนใช้วิธีของ Bradford (32) ในกรณีที่โปรตีนมีความเข้มข้นสูงจะใช้วิธี Lowry หรือ spectrophotometry ที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร

7. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของ mutated α -IPMS กับ native α -IPMS

คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่ศึกษามีวิธีการดังนี้

7.1 การหา molecular weight (MW)

7.1.1 การหา MW ของหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การทำ SDS-PAGE ใช้ polyacrylamide ความเข้มข้น 10% ซึ่งมี SDS อยู่ด้วย 0.1% และใช้ stacking gel ความเข้มข้น 4 % ตามวิธีของ Laemmli (33) และ Weber and Osborn (34) ตัวอย่างจะถูก reduced ด้วย SDS และ dithiothreitol (DTT) ก่อนนำไปทำให้ denature ด้วยการต้ม 3 นาที ปริมาณโปรตีนที่ใช้ใส่ในแต่ละหลุมของเจลมีประมาณประมาณ 300 ไมโครกรัม โดยมี Prestained Protein Marker (Biolab) เป็นโปรตีนอ้างอิง

7.1.2 การหา MW ของเอนไซม์ โดยวิธี non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (ND-PAGE)

ND-PAGE ใช้ช่วยวิเคราะห์เอนไซม์ในการประมาณจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์และการประมาณค่า MW ของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ

7.2 การหาค่า optimum temperature สำหรับการทำงานของเอนไซม์

ค่า optimum temperature หาโดยการหาค่า enzyme activity ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, และ 60°C

7.3 การหาค่า optimum pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์

ค่า optimum pH หาโดยการหาค่า enzyme activity ที่ pH ต่างๆ คือ pH 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9

7.4 การศึกษา pH stability ของเอนไซม์

pH stability ศึกษาโดยการหาค่า enzyme activity หลังจากเก็บไว้ที่ pH ต่างๆ (pH 4, 7.5 และ 8.5) เป็นระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 1 ชม., 3 ชม., 6 ชม., 12 ชม., และ 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 0°C

7.5 การหาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์

การศึกษาในส่วนนี้อาศัยห้องปฏิบัติการเฉพาะ โดยส่งเอนไซม์ไปศึกษาที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในโครงการนี้มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. การสร้าง recombinant plasmid ที่มี mutated *leuA* gene

1.1. การเตรียม fragment ของ mutated gene

1.1.1 Primers

จากข้อมูล *leuA* gene sequence ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ได้ทำการออกแบบ Primers จำนวน 3 คู่ สำหรับใช้ในการสร้าง mutated *leuA* gene โดยเทคนิค PCR โดย Primer คู่ที่ 1 และ 2 ใช้ในการเพิ่มจำนวนส่วนของ *leuA* gene ที่อยู่หน้าและหลัง repeated sequence ตามลำดับ คู่ที่ 3 ใช้ในการเพิ่มจำนวน mutated gene ซึ่งได้จากการนำ fragment ทั้ง 2 ส่วนมาต่อกัน แล้วใช้เป็น template

leu4 : 5' GGAATTCCATATGACAACTTCTGAATCGCCC 3'

leu6 : 5' CGCGGATCCCTAGCGTGCCGCCCGGTTGAC 3'

ImutA : 5' CCGTGACGAGTAAGACGG 3'

ImutB : 5' TACTCGTCACGGAGGCCTCCACATACGCGG 3'

ตารางที่ 1 รายละเอียด Primers ที่ใช้ในการวิจัย

Primer Pairs	ส่วนที่ amplify	ความยาว PCR product
คู่ที่ 1 (<i>leu4</i> - ImutB) : 31/30 mers	ส่วนหน้า repeated sequence ของ <i>leuA</i>	1726 bp
คู่ที่ 2 (ImutA- <i>leu6</i>) : 18/30 mers	ส่วนหลัง repeated sequence ของ <i>leuA</i>	110 bp
คู่ที่ 3 (<i>leu4</i> - <i>leu6</i>) : 31/30 mers	mutated <i>leuA</i>	1836 bp

1.1.2 การเพิ่มจำนวนส่วนของยีน *leuA*

นำ Primers คู่ที่ 1 และ คู่ที่ 2 มาใช้ในการเพิ่มจำนวน ส่วนหน้าและส่วนหลังของ repeated sequence ตามลำดับ DNA fragment ซึ่งมี *leuA* gene ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv อยู่ในรูป plasmid pBB 4.2 (รูปที่3) ทำการเพิ่มจำนวนส่วนของ *leuA* โดยใช้ reaction mixture 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

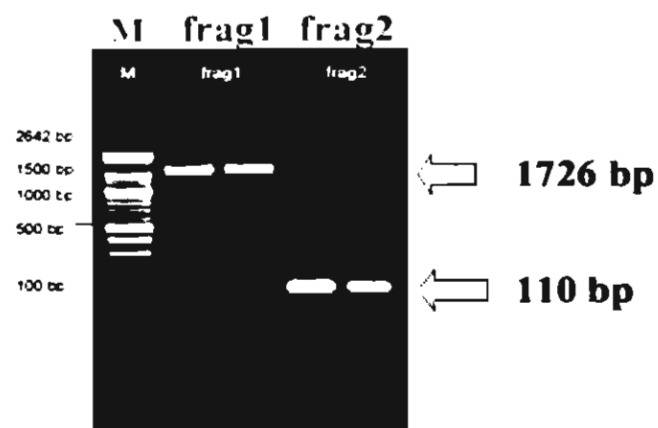
10 X PCR buffer	5 ไมโครลิตร
MgCl ₂	1.25 มิลลิโมลาร์
dNTP (each)	200 ไมโครโมลาร์
primer (each)	1.0 ไมโครโมลาร์
Vent Polymerase	0.4 ยูนิต
DNA template	100 นาโนกรัม

จากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนแต่ละส่วน และ mutated gene แสดงผลที่ได้ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 4

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มจำนวนยีนส่วนของยีน และ mutated gene

Primer	สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนส่วนของยีน				
	MgCl ₂ มิลลิโมลาร์	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
คู่ที่ 1 (<i>leu4</i> - <i>ImutB</i>)	1.25	95°ซ, 1 นาที	64°ซ, 3 นาที	72°ซ, 1.45 นาที	35
คู่ที่ 2 (<i>ImutA</i> - <i>leu6</i>)	1.25	95°ซ, 1 นาที	61°ซ, 3 นาที	72°ซ, 1.45 นาที	35
คู่ที่ 3 (<i>leu4</i> - <i>leu6</i>)	1.25	95°ซ, 1 นาที	64°ซ, 3 นาที	72°ซ, 1.45 นาที	35

Preparation of mutated *leuA* gene by mutagenic PCR procedure



Amplification of gene fragment and preparation of mutated gene

รูปที่ 4 แสดง PCR Product ของการเพิ่มจำนวนส่วนของยีนที่อยู่หน้า repeated sequence ถึง repeated sequence

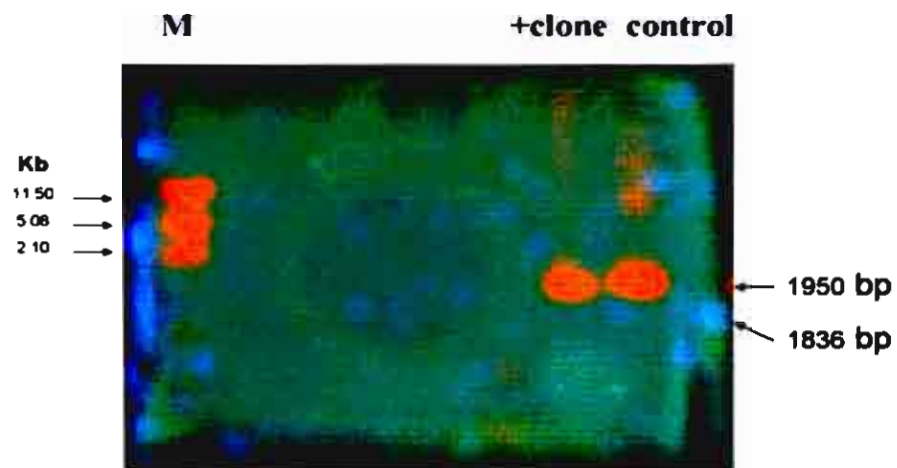
1.2 การเชื่อมต่อ mutated gene เข้ากับเวกเตอร์และการคัดเลือก clone ที่มี recombinant plasmid ที่ต้องการ

นำ PCR product ของ mutated *leuA* gene มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* จากนั้นนำมาผ่าน gel electrophoresis สกัดจาก gel แล้วเชื่อมต่อกับ pET15b expression vector ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งเตรียมเป็น competent cells จากนั้นเพาะเลี้ยงบน L agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

การคัดเลือก clone ที่ต้องการมี 2 วิธี คือ restriction analysis และ PCR amplification of colony lysate

รูปที่ 5 แสดง PCR amplification ของ mutated *leuA* insert จาก colony extract ของ positive clone เมื่อเทียบกับ product จาก template ที่มีขึ้นปกติ

recombinant plasmid carrying mutated gene



selection of positive clone by PCR

รูปที่ 5 PCR amplification ของ mutated *leuA* insert จาก colony extract ของ positive clone เมื่อเทียบกับ control

2. การเตรียมเอนไซม์ α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติและยีนที่เป็น mutated *leuA* gene

2.1 การเตรียม α -IPMS จากยีนปกติ

ทำการเพาะเลี้ยง recombinant clone ที่มี recombinant plasmid ซึ่งมียีน *leuA* ปกติ (pLEU151) อยู่ในโฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ใน LB broth ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. ขวดละ 400 มล. จำนวน 3 ขวด ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งเชื้อเจริญดีและมีค่า OD₆₀₀ อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จึงเติมสารละลาย IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชม. จึงปั่นเก็บตะกอนเซลล์และล้างบัฟเฟอร์ค่าน้ำหนักเซลล์เปียก

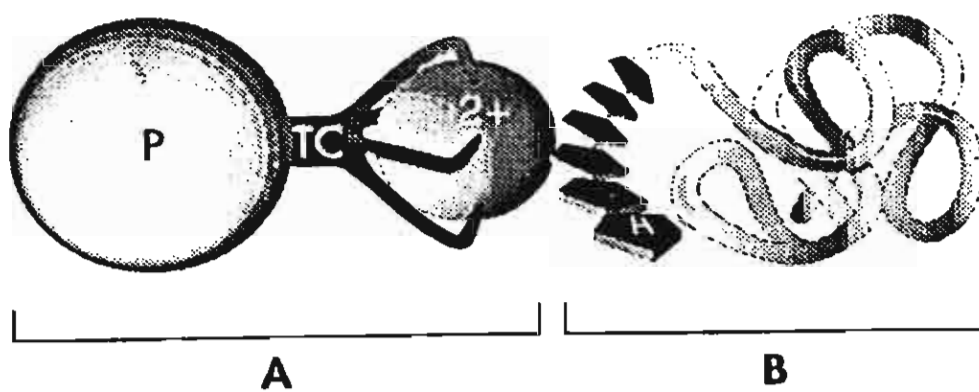
ตารางที่ 3 แสดงค่า OD₆₀₀ และน้ำหนักของเซลล์ที่เตรียมสำหรับการใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์ α -IPMS จากยีนปกติ

ตารางที่ 3 ค่า OD₆₀₀ และน้ำหนักเซลล์เปียกที่ได้จากการเพาะเชื้อ (ขวดละ 400 มล.) เพื่อเตรียม α -IPMS

ขวดเลี้ยงเชื้อ	OD ₆₀₀	น้ำหนักเซลล์เปียก (กรัม)
1	0.562	2.0923
2	0.564	2.2122
3	0.552	2.0945

นำตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาเตรียม crude extract ตามวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้นและเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography ตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ที่ได้ ได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีน SDS-PAGE และตรวจดู enzyme activity

ผลการทำ SDS-PAGE ของ crude extract และ purified α -IPMS ที่ผลิตจากการทำ protein expression ของ *leuA* gene ปกติพบว่าเอนไซม์ α -IPMS จาก SDS-PAGE มีขนาดของ subunit ประมาณ 80 kDa



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงการทำแอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยใช้ Immobilized Metal Affinity Chromatography System

A : Metal Affinity Rasin (P: Sepharose, TC: Tetradenate chelator, 2+: metal ion)

B : H : Histidine - tagged recombinant protein