



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาการแสดงออกของ **chitinase** จาก  
***Bacillus circulans* No.4.1** บนผิวของยีสต์

ผศ.ดร.สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

15 พฤษภาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG 5180185

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาการแสดงออกของ chitinase จาก  
*Bacillus circulans* No.4.1 บนผิวของยีสต์

ผศ.ดร.สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงประยุกต์ โดยนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อพัฒนารูปแบบการใช้  
งานของเอนไซม์โคติเนสเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุม  
โรคพืชโดยชีววิธี งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากหลายภาคส่วนได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการการ  
อุดมศึกษา (สกอ.) และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สนับสนุนในรูปของทุนพัฒนา  
ศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2551 ในส่วนของคณะเภสัชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยศิลปากร ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและสถานที่ นอกจากนี้ Professor Mitsuyoshi  
Ueda จากมหาวิทยาลัยเกียวโต และ Dr. Tomohiro Akashi จากมหาวิทยาลัยนาโกย่า และ Dr.  
Tomoo Ogi จากมหาวิทยาลัยนางาซากิ ประเทศญี่ปุ่น เป็นผู้สนับสนุนสายพันธุ์ของยีสต์ พลาสมีด  
และให้คำแนะนำในเรื่องเทคนิคต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย

สุดท้ายนี้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้เนื่องจากได้รับคำแนะนำ กำลังใจ ข้อเสนอแนะ  
ตลอดจนความช่วยเหลือจาก รศ.ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็น  
นักวิจัยที่ปรึกษา (mentor) ของโครงการนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG 5180185

ชื่อโครงการ : การพัฒนาการแสดงออกของ chitinase จาก *Bacillus circulans* No.4.1 บนผิวยีสต์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

E-mail Address : [limsirichaikul@hotmail.com](mailto:limsirichaikul@hotmail.com)

ระยะเวลาโครงการ : ตั้งแต่วันที่ 11 มิถุนายน 2551 ถึงวันที่ 15 พฤษภาคม 2553

ไคตินเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยสลายไคตินซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในแมลงและเชื้อรา มีผู้วิจัยใช้ไคตินเนสในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยา และการปนเปื้อนของสารเคมีต่อสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบการนำไคตินเนสมาใช้นั้นอาจยังไม่มีประสิทธิภาพพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเสนอการนำไคตินเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* No.4.1 มาใช้ในรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์บนผิวของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยการนำยีนไคตินเนสจากเชื้อดังกล่าวต่อกับ 3' half agglutinin and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored signal และควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ GAPDH นอกจากนั้นได้ใช้ EGFP ต่อต้าน N-terminal เพื่อความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ จากการตรวจวิเคราะห์ด้วย colorimetry โดยมี 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobiose และ p-nitrophenyl-diacetyl-chitobiose เป็นสารตั้งต้นพบว่า ไคตินเนสที่แสดงที่ผิวของยีสต์สามารถทำงานได้ผลมากกว่ายีสต์ที่ไม่มีไคตินเนสถึง 7 เท่า และ 4 เท่าตามลำดับ และผลจากการทำ Immunofluorescent และสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นว่าไคตินเนส สามารถแสดงออกที่ผิวของยีสต์และสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยใช้ราที่ก่อโรคในพืช พบว่าไคตินเนสที่แสดงออกบนผิวยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีโดยเฉพาะผลต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* ดังนั้นการแสดงออกของเอนไซม์ไคตินเนส บนผิวยีสต์นี้มีศักยภาพที่จะพัฒนาใช้เป็นตัวควบคุมโดยชีววิธีได้ในอนาคต

**Keywords :** ไคตินเนส (chitinase), การควบคุมโดยชีววิธี (biocontrol), การแสดงออกของโปรตีนบนผิวยีสต์ (yeast surface display), ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity), *Fusarium oxysporum*

## Abstract

---

Project Code : MRG 5180185

Project Title : Yeast surface display of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1

Investigator : Dr. Siripan Limsirichaikul Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

E-mail Address: [limsirichaikul@hotmail.com](mailto:limsirichaikul@hotmail.com)

Project Period : June 11, 2010 – May 15, 2010

Chitinase, one of chitinolytic enzymes, mainly digests chitin which is a major component in various organisms, including fungus and insect. Chitinase is promising for biocontrol instead of chemical pesticide which produced many following problems about resistance and environment contamination. However, the implementation of bacterial chitinase has some constraints. We adopted new approach of utilizing chitinase for biocontrol application by immobilized and presented chitinase on the yeast cell surface in consideration to enhance its biocontrol efficacy. To display on surface of *Saccharomyces cerevisiae*, gene of chitinase from *Bacillus circulans* was fused with 3' half agglutinin and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored signal, and then expressed under regulation of GAPDH promoter. To monitor surface expression, enhanced green fluorescent protein (EGFP) was conjugated at N-terminal of chitinase. Yeast surface display of chitinase showed very high activity against 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobiose up to seven-fold higher than parent strain of *S. cerevisiae*. Yeast surface display of chitinase also hydrolyzed p-nitrophenyl-diacetylchitobiose up to 3-4 folds higher than no anchoring fragment. It suggested that chitinase was successfully expressed on yeast with active form and revealed higher activity than control. In addition, chitinase on yeast surface display show an antifungal activity against plant pathogenic fungi, especially, *Fusarium oxysporum*; this chitinase-yeast surface display may prove as a potential biocontrol for plant pathogenic fungi.

**Keywords** : chitinase, biocontrol, yeast surface display, antifungal activity, *Fusarium oxysporum*

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### การพัฒนาการแสดงออกของ chitinase จาก *Bacillus circulans* No.4.1 บนผิวของยีสต์

#### Executive Summary

เทคนิคการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของยีสต์ โดยใช้โคติเนสเป็นตัวอย่าง เพื่อพัฒนารูปแบบของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพการทำงานได้มากขึ้นในอนาคต โดยเริ่มจากการสร้างเวกเตอร์แสดงออก (expression vector) ที่มียีนโคติเนส จาก *Bacillus circulans* ดัดแปลงโดยเติม 6xhistidine และ EGFP (Enhanced green fluorescent protein) ที่ปลาย N-terminal และ เติม secretion signal, 3' half agglutinin และ GPI anchor ด้านปลาย C-terminal ของโคติเนส โดยกำหนดให้โปรตีนนี้แสดงออกบนผิวของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้งหมด 2 สายพันธุ์คือ MT8-1 และ CB018 ซึ่งตรวจสอบผลการแสดงออกของโคติเนสบนผิวของยีสต์โดย 4 วิธี (1) ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โคติเนส (specific activity) โดยวัดปริมาณของสาร 4-methyl umbelliferrone (4-MU) และ p-nitrophenyl ที่เกิดด้วยวิธี spectrophotometry (2) การตรวจหาโปรตีนโคติเนส ด้วยเทคนิค western blot และ (3) การตรวจสอบด้วยเทคนิค immunofluorescent ภายใต้กล้อง fluorescent microscope และ (4) การตรวจหาฤทธิ์การต้านเชื้อราที่ก่อโรค ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าแสดงออกของโคติเนสบนผิวของยีสต์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในพืชได้

#### เนื้อหาการวิจัย

##### วัตถุประสงค์ของโครงการ (Objective)

ศึกษาและพัฒนาระบบการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวของยีสต์โดยใช้โคติเนสเป็นตัวอย่าง

##### การดำเนินงานวิจัย (Methods)

- 1 การเตรียมยีนโคติเนส เวกเตอร์แสดงออก และสายพันธุ์ยีสต์
- ยีนโคติเนสจาก *Bacillus circulans* No.4.1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
  - ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 สายพันธุ์คือ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ MT8-1 (MAT $\alpha$ , ade, his3, leu2, trp1, ura3) และ CB018 (MATa, pep4::HIS3, prb1::hisG, prc1::hisG, ade2-1, can1-100, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ura3-1) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงเพื่อลดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในเซลล์
  - เวกเตอร์แสดงออก (expression vector) ที่ใช้เพื่อแสดงออกของโปรตีนที่ผิวของยีสต์ (expression vector) ชนิด pERS มี URA3 เป็นยีนคัดเลือก (gene marker) เวกเตอร์นี้ดัดแปลงจาก pRS406 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Mitsuyoshi Ueda มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น

## 2 การโคลนยีนไคติเนส

โคลนยีนไคติเนสโดยใช้เทคนิค PCR และนำเข้าเวกเตอร์ pJET (Fermentas, USA).

- เตรียมยีนไคติเนสโดย PCR โดยมีพลาสมิดของยีนไคติเนสจาก *B. circulans* เป็น template และใช้ primer 2 สายคือ ChiSacII-EcoRI-Fo (5' GTT TCT GCC GCG GAA TTC ATT AAA GAG GAG 3' ) และ ChiPstI R2 (5' GCG ATC GTC AGC AAG TAT TC 3') และเพิ่มจำนวนด้วย Pyrobest (Takara, Japan) ซึ่งเป็น high fidelity DNA polymerase สาย DNA ของไคติเนสที่ได้ต้องมีขนาดประมาณ 1.5 kb ซึ่งปลายด้าน 5' มี 6xhistidine
- นำสาย PCR ที่ได้โคลนใส่ในเวกเตอร์ pJet และเพิ่มจำนวนใน *Escherichia coli* โดยมียีนต้าน ampicillin เป็นยีนคัดเลือก (gene marker)
- ตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่ได้ด้วย restriction analysis

## 3 การเตรียมยีนไคติเนสให้อยู่ในเวกเตอร์สำหรับแสดงออกของโปรตีนบนผิวยีสต์

การโคลนยีนไคติเนสที่เตรียมได้จากข้อ 2. เข้าเวกเตอร์ pIRS นั้นจำเป็นต้องปรับลำดับเบสของยีนไคติเนสให้เหมาะสมกับ expression vector โดยทำ DNA cassette mutagenesis โดยวิธี PCR โดยมีรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงดังนี้

- เปลี่ยนลำดับเบสของ SacII ที่ตำแหน่ง 1127 ของยีนไคติเนส โดยวิธี DNA cassette mutagenesis ซึ่งอาศัยเทคนิค PCR และ primer 4 เส้นดังนี้ (1) ChiSacII-EcoRI-Fo, (2) ChiPstI R2, (3) ChiSacII\* R1', และ (4) ChiSacII\* F2'
- โคลนสาย DNA ที่ได้จากข้างต้นเข้าสู่เวกเตอร์ pIRS ที่ตำแหน่ง SacII และ XhoI
- เพิ่มจำนวนพลาสมิดที่ได้ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 alpha โดยมียีนต้าน ampicillin เป็นยีนคัดเลือก
- ตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่ได้ด้วย restriction analysis และ DNA sequencing

ตารางที่ 1 ตารางแสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

| ชื่อไพรเมอร์      | ลำดับเบส                              | ส่วนของยีน                                           |
|-------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| ChiSacII-EcoRI-F0 | 5' GTTCTGCCGCGGAATTCATTAAAGAGGAG 3'   | 5'-fragment of chitinase                             |
| ChiPstI R2        | 5' GC ATCGTCAGCAAGTATTC 3'            | 5'- fragment of chitinase                            |
| ChiSacII* R1      | 5'GTTTAAAGTTGCCACGGATCGGTTTCATC 3'    | Mutagenesis SacII ในส่วนของ 5'-fragment of chitinase |
| ChiSacII* F2      | 5' GATGAACCGATCCGTGGCAACTTTAAAC 3'    | Mutagenesis SacII ในส่วนของ 5'-fragment of chitinase |
| ChiPstI 1400 F3   | 5' GAAATTACACGCTGCTCCTG 3'            | 3'-fragment of chitinase                             |
| ChiNonstopXhoI R2 | 5' ATACTCGAGGGCTTTAAATGACACG 3'       | 3'-fragment of chitinase                             |
| yEGFP/SacII F     | 5' GCCGCGGATGTCTAAAGGTGAAGAATT 3'     | yEGFP                                                |
| yEGFP/SacII R     | 5' TTCCGCGGCTTTGTACAATTCATCCATAC 3'   | yEGFP                                                |
| KpnI/stop R       | 5'- CGGTACCTcaAATGACACGACATATTCGGT 3' | Deletion of 3'agglutinin and GPIanchor               |

4 การสร้างโคติเนส ที่ติดกับ EGFP ด้านปลาย N-terminal ทั้งที่สามารถแสดงออกที่ผิวของยีสต์ หรือไม่สามารถแสดงออกที่ผิวของยีสต์ได้

- EGFP สำหรับแสดงออกในเซลล์ยีสต์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Tomohiro AKASHI คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนาโกย่า ประเทศญี่ปุ่น และเพิ่มจำนวนโดย PCR ด้วยไพรเมอร์ yEGFP/SacII F และ yEGFP/SacII R ก่อนนำเข้าเวกเตอร์ในข้อ 3 ที่ตำแหน่ง SacII จะได้โคลนที่สามารถแสดงออก EGFP ที่ผิวของยีสต์
- การสร้างโคลนที่สามารถแสดงออกของโปรตีนโคติเนส แต่ไม่สามารถแสดงออกที่ผิวของยีสต์ได้ โดยการตัดส่วนของ 3' half ของยีน agglutinin และ GPI anchor signal sequence โดยใช้ไพรเมอร์ ChiPstI 1400 F3 และ KpnI/stop R และนำกลับเข้าสู่พลาสมิดข้างต้นที่ตำแหน่ง PstI และ KpnI
- ตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วย restriction analysis และ sequencing

#### 5 การนำส่งยีนโคติเนสเข้าสู่ยีสต์

- พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3 และ 4 นำส่งเข้าเซลล์ของยีสต์ MT8-1 และ CB018 โดยวิธี electroporation โดยใช้ cuvette ขนาด 2 มิลลิเมตร ด้วยกระแสไฟฟ้า 1.5 กิโลโวลท์, 12 ไมโครฟาลัด
- คัดเลือกและเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่เหมาะสม (SD ที่มี uracil) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้เฉพาะยีสต์ที่ได้รับ พลาสมิดที่ถูกต้องสามารถเจริญเติบโตได้ และสามารถแสดงออกเอนไซม์โคติเนสที่ผิวด้านนอก ภายใต้การควบคุมของ GAPDH promoter
- ตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องด้วยเทคนิค colony PCR เพื่อตรวจสอบโคติเนสระดับ DNA

#### 6 ตรวจสอบผลการแสดงออกของเอนไซม์โคติเนสระดับโปรตีน

- ตรวจหาการแสดงออกของโคติเนสด้วยเทคนิค Western blot analysis เป็นการตรวจหาปริมาณ โดยสังเขปและตรวจเอกลักษณ์ของโคติเนสที่แสดงออกโดยใช้เทคนิคการทำ Western blot analysis และใช้แอนติบอดีต่อ EGFP (1:500) ที่ปลาย N-terminal ของโคติเนส ทั้งนี้วิธีการทำได้ดัดแปลงจากการทดลองของ Kato, Kuzuhara et al. 2006 ตัวอย่างที่ใช้เป็นการแยกส่วนของผนังเซลล์ และ ส่วนอื่น โดยเริ่มจาก เลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแต่ละตัวอย่างเพื่อเก็บเซลล์ให้ได้  $5 \times 10^8$  เซลล์ต่อตัวอย่าง และล้างด้วยน้ำสองครั้ง จากนั้นย่อยเซลล์ด้วยการเขย่าแรงๆใน lysis buffer (5 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7.4, 2mM PMSF) และ glass bead เป็นเวลา 1 นาทีและพักในน้ำแข็ง 1 นาที สลับกัน จำนวน 10 รอบ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg 10 นาที ส่วนของตะกอนที่ได้ เป็นส่วนของผนังเซลล์ นำส่วนใสด้านบนปั่นเหวี่ยงต่อด้วยความเร็ว 20000xg 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้นำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 20%TCA และล้างด้วย acetone ก่อนนำไปทดสอบด้วย western blot analysis
- ตรวจดูการแสดงออกที่ผิวของยีสต์ด้วยการทำ immunofluorescence ด้วยแอนติบอดีต่อ EGFP ที่ติดด้าน N-terminal ของโคติเนสเป็น primary antibody (1:100) และ goat-antimouse ที่ติดฉลาก

ด้วย Alexafluor 594 เป็น secondary antibody (1:500) หรือสังเกตการเรืองแสงของ EGFP โดยตรงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

#### 7 การตรวจสอบฤทธิ์ของไคติเนสที่แสดงออกที่ผิวยีสต์

- การตรวจสอบฤทธิ์ของไคติเนสที่แสดงออกที่ผิวยีสต์ด้วย colorimetry โดยใช้ para-nitrophenyl diacetyl chitobiose เป็นสารตั้งต้น (substrate) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาต่าง ๆ จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ nitrophenol เพื่อคำนวณฤทธิ์ (Activity) โดย

1 unit = ปริมาณ nitrophenol ที่เกิดขึ้นต่อชั่วโมง ต่อ  $10^6$  เซลล์ของยีสต์

- การเตรียม standard curve ของ nitrophenol (N7600, sigma) โดยละลายในบัฟเฟอร์ และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

#### 8 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อรา

- การตรวจสอบใช้เชื้อราที่ก่อโรคในพืชผักของประเทศไทยในปัจจุบันจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรทั้งหมด 5 สายพันธุ์ดังนี้ (1) *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., (2) *Fusarium oxysporum*, (3) *Fusarium moniliforme* Sheldon, (4) *Rhizoctonia solani*, (5) *Collectotrichum gloeosporioides* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 °C สำหรับการเก็บรักษา และ ที่อุณหภูมิ 30 °C สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อรา

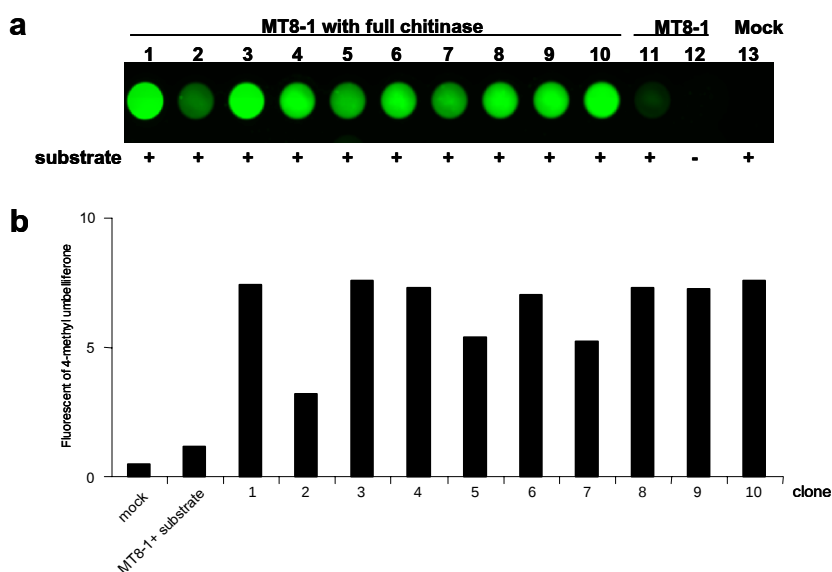
- เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ 6 สายพันธุ์คือ parent strain ของ CB018 และ MT8-1, chitinase-EGFP with GPI บนผิวยีสต์ CB018 และ MT8-1 และ chitinase-EGFP without GPI ในเซลล์ของยีสต์ CB018 และ MT8-1 ในอาหาร SD ที่มีกรดอะมิโนดังนี้ Trp, His, Leu, Ade ส่วนใน parent strain ต้องเพิ่ม Ura ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

- วัดปริมาณเชื้อ ให้ได้ 5 OD ปั่นเก็บเชื้อยีสต์ที่ได้และ spread บนอาหาร PDA จากนั้น inoculate เชื้อราสายพันธุ์ต่างๆที่เตรียมลงตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C วัดผลของการเจริญเติบโตของเชื้อทุกวัน ทั้งนี้ผลทดลองได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

## ผลงานวิจัยที่ได้รับ (Results)

1 การเตรียมโคลนที่มียีนไคติเนสเพื่อให้แสดงออกที่ผิวของยีสต์มีโครงสร้างพื้นฐานจากด้านปลาย N-terminal จะมีส่วนของ histidine 6 โมเลกุลต่อกับไคติเนสจาก *Bacillus circulans* ซึ่งในบางการทดลองมีการเติม EGFP ที่เหนือตำแหน่ง (upstream) ของ histidine ส่วนปลาย C-terminal ต่อกับ 3'-half ของยีน agglutinin และ GPI anchor signal sequence เพื่อให้แสดงออกที่ผิวของยีสต์ได้ ในกรณีของบางการทดลองที่ออกแบบให้มีการแสดงออกของไคติเนสแต่ไม่สามารถส่งออกไปแสดงที่ผิวนั้นทำได้โดย การไม่เติมส่วนของ 3'-half ของยีน agglutinin และ GPI anchor signal sequence ในพลาสมิด

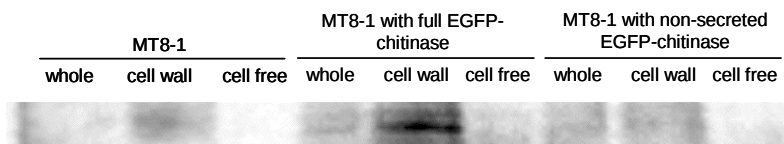
2 การตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไคติเนสที่ผิวของยีสต์ การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบและคัดเลือกโคลนที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไคติเนสที่ผิวของยีสต์ โดยทดสอบการย่อยสารตั้งต้น 4-methyl umbelliferyl diacetylglucosaminoglycan (4-MU GlcNac<sub>2</sub>) และเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ 4-Methylumbelliferone โดยประมาณด้วยเครื่อง Ettan DIGE ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งพบว่าโคลนส่วนใหญ่สามารถย่อยสารตั้งต้นได้ดีมากกว่า 10 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่ไม่มีการแสดงออกของไคติเนสที่ผิว หรือ mock ที่มีเพียงสารตั้งต้น หรือ ยีสต์อย่างเดียวแต่ไม่มีสารตั้งต้น



รูปที่ 1 การตรวจสอบและคัดเลือกโคลนที่มีประสิทธิภาพการทำงานของไคติเนสที่ผิวของยีสต์ ใช้สาร 25 mM 4-methyl umbelliferyl diacetylglucosaminoglycan (4-MU GlcNac<sub>2</sub>) เป็นสารตั้งต้น (a) ผลการเรืองแสงของ 4-methylumbelliferone ของโคลนที่ 1-10 (lane1-10), ยีสต์ที่ไม่มีการแสดงออกของไคติเนสที่มีสารตั้งต้น (lane 11) และไม่มีสารตั้งต้น (lane 12) (b) ปริมาณความเข้มของสารเรืองแสงในโคลนต่างๆ

### 3 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนไคตินเนสด้วยเทคนิค western blot analysis

การตรวจสอบการแสดงออกของไคตินเนสที่ผิวของเซลล์ยีสต์ โดยเปรียบเทียบเซลล์ของยีสต์ 3 ชนิดคือ (1) ยีสต์ที่มีการแสดงออกของไคตินเนสที่ผิว (2) ยีสต์ที่มีการแสดงออกของไคตินเนสแต่ไม่แสดงออกที่ผิวเซลล์ และ (3) ยีสต์ที่ไม่มีการแสดงออกของไคตินเนส ทั้งนี้ใช้ไคตินเนสที่ต่อกับยีน EGFP และตรวจผลด้วยแอนติบอดีต่อ GFP (sigma) โดยพบว่าการแสดงออกของไคตินเนสที่ต่อกับ EGFP เฉพาะที่ส่วนของผนังเซลล์ของยีสต์ที่สร้างขึ้นให้มีการแสดงออกที่ผิวเท่านั้น แต่ไม่พบไคตินเนสในส่วน of cell free ไม่ว่าจากยีสต์ชนิดใด ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นในเซลล์มีน้อยเกินกว่าที่จะตรวจพบ ในรายงานนี้ได้ตรวจสอบทั้งสายพันธุ์ MT8-1 (รูปที่ 2) และ CB018 ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน

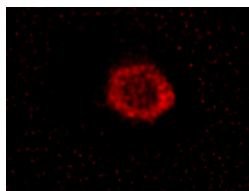


**รูปที่ 2 WesternBlot analysis** ของ โปรตีนไคตินเนสที่ต่อเชื่อมกับโปรตีน EGFP ในยีสต์สายพันธุ์ MT8-1 ที่ให้มีการแสดงออกของไคตินเนสที่ผิวของยีสต์ (MT8-1 with full EGFP chitinase) และให้ของไคตินเนสแต่ไม่ออกมาที่ผิวของยีสต์ (MT8-1 with non-anchored of EGFP chitinase) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่ใส่พลาสมิด (MT8-1) โดยใช้แอนติบอดีต่อ EGFP ความเข้มข้น 1:500 (Sigma)

### 4 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนไคตินเนสด้วยเทคนิค immunofluorescence

-การตรวจสอบการแสดงออกของไคตินเนสที่ผิวของยีสต์ด้วยเทคนิคการทำ

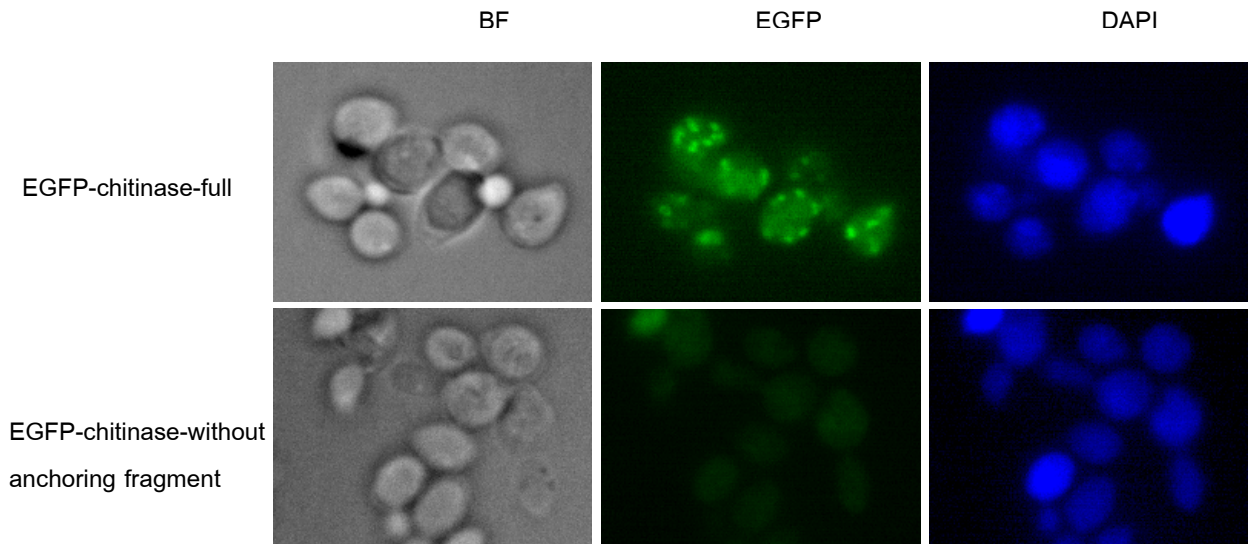
immunofluorescent โดยใช้แอนติบอดีต่อ EGFP ที่ต่อกับไคตินเนสด้านปลาย N-terminal และใช้ secondary antibody ที่ต่อกับ Alexa594 และตรวจดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ พบว่าการเรืองแสงเฉพาะบริเวณรอบนอกของเซลล์ยีสต์



**รูปที่ 3 Immunofluorescent of EGFP-chitinase** ที่ผิวของยีสต์ MT8-1 โดยใช้การย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ EGFP (Sigma, 1:500) และใช้ แอนติบอดีต่อ mouse ที่ต่อกับ Alexafluor594 (Invitrogen, 1:1000)

##### 5. การตรวจสอบการเรืองแสงที่ผิวยีสต์ของ EGFP โดยตรง

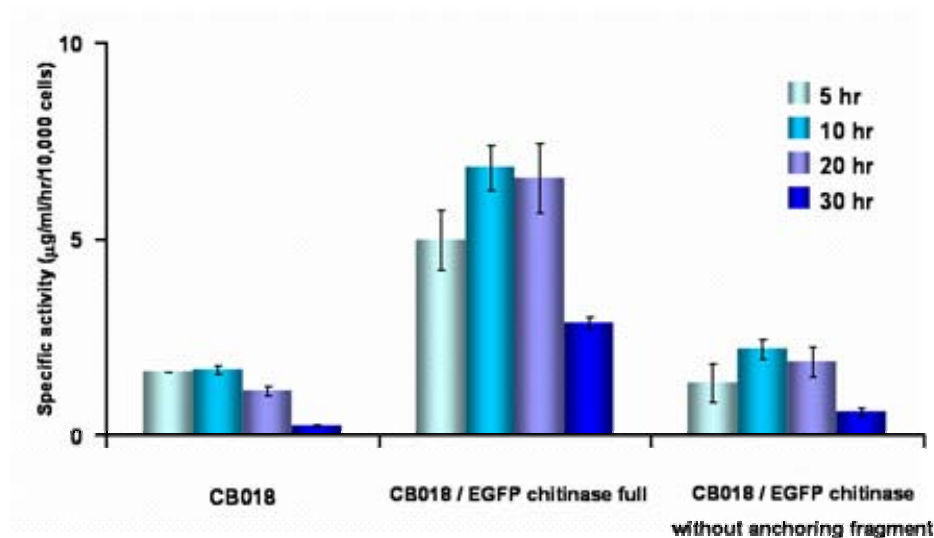
EGFP ที่ปลายโคติเนสด้าน N-terminal นั้นสามารถเรืองแสงบริเวณผิวของยีสต์ในเฉพาะกรณี ที่เชื่อมต่อกับ 3' agglutinin และ GPI anchored signal เท่านั้น ในยีสต์ที่ไม่มีส่วนของ anchored signal จะไม่สามารถแสดงออกที่ผิวได้ ดังแสดงในรูป 4



รูปที่ 4 การแสดงออกของ **EGFP-chitinase** ในยีสต์สายพันธุ์ **CB018** เซลล์ยีสต์ที่มีโคติเนสต่อกับ EGFP และ anchoring fragment (EGFP-chitinase-full) และ เซลล์ยีสต์ที่มีโคติเนสต่อกับ EGFP แต่ไม่มี anchoring fragment (EGFP-chitinase-without anchoring fragment) ถูกตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ที่กำลังขยาย 100x และบันทึกภาพ BF= bright field, EGFP = enhanced green fluorescence ย้อมส่วนโคติเนสที่ติดกับ EGFP, DAPI = 4'-6-Diamidino-2-phenylindole สำหรับย้อมส่วน DNA

##### 6 การตรวจสอบฤทธิ์ของโคติเนสที่แสดงออกที่ผิวยีสต์

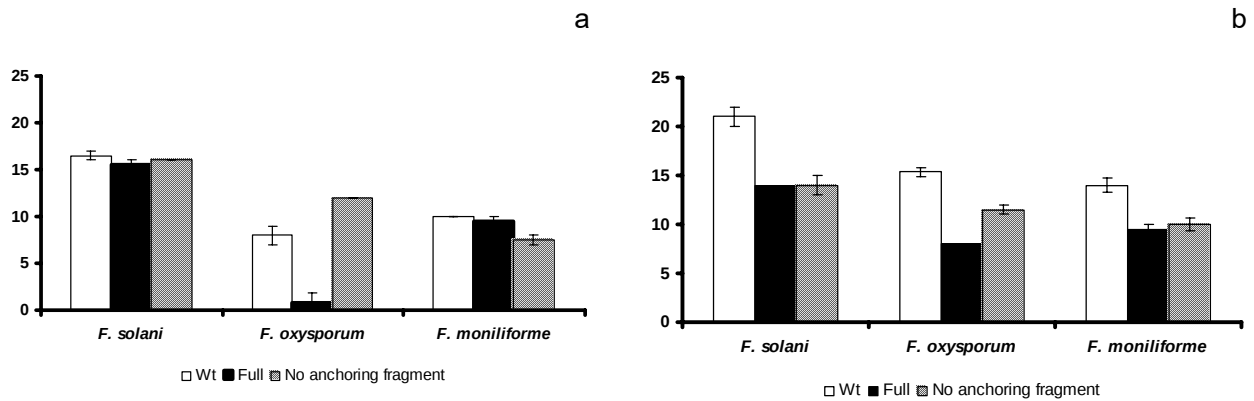
- การตรวจสอบฤทธิ์ของโคติเนสที่แสดงออกที่ผิวยีสต์ด้วย colorimetry โดยใช้ para-nitrophenyl diacetyl chitobiose เป็นสารตั้งต้น (substrate) เมื่อพิจารณาที่ค่าของ specific activity ของโคติเนส พบว่าที่เวลา 5-30 ชั่วโมงนั้นโคติเนสที่แสดงออกบนผิวของเซลล์สามารถทำงานย่อยสารตั้งต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่ายีสต์ทั่วไป หรือยีสต์ที่ไม่มีโคติเนสบนผิวประมาณ 4-5 เท่า แต่อย่างไรก็ตามเราพบว่าในยีสต์ปกติก็สามารถย่อยสารตั้งต้นเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์โคติเนสที่มีในยีสต์อยู่แล้ว (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 **Specific activity** ของไคติเนส วัดจากประสิทธิภาพการย่อยสาร para-nitrophenyl diacetyl chitobiose ของไคติเนสที่เวลาต่างๆ ในตัวอย่าง CB018 (parent yeast), CB018/EGFPchitinase full (ไคติเนสที่แสดงออกบนผิวของ CB018) และ CB018/EGFP chitinase without anchoring fragment (ไคติเนสที่ไม่แสดงออกบนผิวของ CB018) ที่อุณหภูมิ 30 °C

#### 7 ผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคในพืช

จากการทดสอบพบว่ายีสต์ที่แสดงออกไคติเนสบนผิวนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเฉพาะ *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Collectotrichum gloesporioides* เมื่อเทียบกับ parent ยีสต์ และยีสต์ที่ไม่แสดงออกไคติเนสบนผิวเซลล์ (รูปที่ 6) ซึ่งทำให้เห็นว่าการติดไคติเนสไว้บนผิวของยีสต์นั้นช่วยให้ผลการยับยั้งเชื้อราดีขึ้น และสามารถเป็นแนวทางในการนำไปใช้เพื่อควบคุมเชื้อราในพืชได้ในอนาคต



รูปที่ 6 ภาพการต้านเชื้อราของโคติเนสบนผิวยีสต์ โดยวัดอัตราการเจริญเติบโตจากรัศมีการเจริญของเส้นใย (cm.) ของเชื้อราต่างๆ ได้แก่ *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* Sheldon บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สายพันธุ์ CB018 (a), และ MT8-1 (b) ที่เป็น parent strain (white bar), chitinase with anchoring fragment (black bar) และ no anchoring fragment (striped bar)

### สรุปผลการทดลอง

การแสดงออกของเอนไซม์โคติเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* บนผิวของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นั้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของเอนไซม์โคติเนส นอกจากนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคในพืชได้ จึงเป็นแนวทางที่จะประยุกต์ใช้สำหรับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

### เอกสารอ้างอิง

- Chuang, H. H. and F. P. Lin (2007). "New role of C-terminal 30 amino acids on the insoluble chitin hydrolysis in actively engineered chitinase from *Vibrio parahaemolyticus*." Appl Microbiol Biotechnol 76(1): 123-33.
- Frandsen, E. and J. Schnurer (1994). "Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, p-nitrophenyl-beta-D-N,N'-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria." J Appl Bacteriol 76(3): 259-63.
- Kato, M., Y. Kuzuhara, et al. (2006). "Analysis of a processing system for proteases using yeast cell surface engineering: conversion of precursor of proteinase A to active proteinase A." Appl Microbiol Biotechnol 72(6): 1229-37.

**Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และ หน้า)

ยังอยู่ระหว่างการดำเนินงาน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ไม่มี

อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

- ประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 9 วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรม ฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ

- อยู่ระหว่างการนำเสนอในงานประชุม “ 8th International Symposium on BIOCONTROL AND BIOTECHNOLOGY” October 4-6, 2010 at Pattaya, Chonburi Province, Thailand