การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase จาก *Lactobacillus buchneri*

Cloning of 1,3-Propanediol dehydrogenase-encoding gene from *Lactobacillus buchneri*

พิทักษ์ ภูเนานิล[1] โชติกา ฉัตรเกษม[1] และ อัชฌา อรอินทร์[1, 2*]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2]ศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรติโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

Pitak Bhunaonin[1] Chotika Chatgasem[1] and Atcha Oraintara[1, 2*]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Meuang, Khon Kaen, 40002 Thailand

[2]Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes, Meuang, Khon Kaen, 40002 Thailand

[*]Corresponding Author, E-mail: atcha@kku.ac.th

Received: 5 November 2020 | Revised: 5 December 2020 | Accepted: 7 December 2020

บทคัดย่อ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมด้านเชื้อเพลิงชีวภาพมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้กลีเซอรอล ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมาก กลีเซอรอลสามารถเปลี่ยนเป็นสาร 1,3-Propanediol (1,3-PD) ซึ่งเป็นสารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมหลายชนิด งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *dhaT* ซึ่งถอดรหัสเป็นเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH) ซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ในวิถีการเมแทบอลิซึมกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-PD โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน *dhaT* จาก *Lactobacillus buchneri* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) จากนั้นเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับเวคเตอร์พาหะ pET-28a(+) และนำเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 ทำการตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค colony PCR และสกัดพลาสมิดลูกผสมเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการทดลองพบว่า สามารถโคลนยีน *dhaT* ซึ่งมีขนาด 1,200 คู่เบส จาก *L. buchneri* ได้สำเร็จ จากการวัดกิจกรรมเอนไซม์ 1,3-PDH ของ *E. coli* ลูกผสมพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 154.228 mU/ml ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวใน *L. buchneri* มีค่าเท่ากับ 208.793 mU/ml จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่างานวิจัยนี้สามารถแสดงออกโปรตีนจากยีน *dhaT* ที่โคลนเข้าไปได้สำเร็จ ซึ่งจะได้นำความรู้จากงานวิจัยนี้ไปศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาการผลิตสาร 1,3-PD จากกลีเซอรอลต่อไป

ABSTRACT

Nowadays, Biofuel industry is growing rapidly, resulting in an increasing level of glycerol which is a byproduct from biofuel production. Glycerol can be converted to 1,3-Propanediol (1,3-PD) which is a chemical precursor presenting in many industrial applications. In microbial metabolic pathway, *dhaT* encodes 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH), which leads to synthesis of 1,3-PD. In this study, *dhaT* gene from *Lactobacillus buchneri*

was amplified by polymerase chain reaction (PCR), then inserted into expression vector pET-28a(+) and subsequently introduced into *Escherichia coli* BL21. The correct transformants were screened by colony PCR and recombinant plasmid was isolated and sequenced. The result showed that the *dhaT* gene from *L. buchneri* was successfully cloned. The activity of 1,3-PDH was 154.228 mU/ml in recombinant *E. coli* while the activity of the same enzyme was 208.793 mU/ml in *L. buchneri*. The results suggest that the *dhaT* gene was successfully expressed in this work and might provide further knowledge to develop genetically engineered *Escherichia coli* strain for producing 1,3-PD from glycerol in the future.

คำสำคัญ: 1,3-Propanediol dehydrogenase *dhaT* *Lactobacillus buchneri*
Keywords: 1,3-Propanediol dehydrogenase, *dhaT*, *Lactobacillus buchneri*

บทนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมด้านเชื้อเพลิงชีวภาพมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมาก จึงต้องหาวิธีในการเพิ่มมูลค่าให้กับกลีเซอรอล ที่ผ่านมามีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในการเปลี่ยนแปลงสสารโดยกระบวนการทางชีวภาพหรือกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแทนการใช้คาร์โบไฮเดรต (Maervoet et al., 2011) และมีแนวทางโดยนำกลีเซอรอลไปเพิ่มมูลค่าโดยเปลี่ยนเป็นสารเคมีต่าง ๆ เช่น สาร 1,3-Propanediol เป็นต้น

สาร 1,3-Propanediol มักถูกนำไปใช้เป็นโมเลกุลหน่วยย่อย (monomers) เพื่อสังเคราะห์โพลีเอสเตอร์ (polyesters) ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการผลิตเสื่อ (Biebl et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น ใช้เป็นสารยึดเกาะ สารลดแรงตึงผิว สารหล่อลื่น หรือนำมาผลิตเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) เป็นต้น (Liu et al., 2009) การสังเคราะห์สาร 1,3-Propanediol ด้วยวิธีการทางเคมีต้องใช้ต้นทุนสูง และก่อให้เกิดสารพิษซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น กระบวนการผลิตสาร 1,3-Propanediol ด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการหมักกลีเซอรอลของจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นทรัพยากรที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ (renewable resources) เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักอีกด้วย

โดยทั่วไปเมื่อกลีเซอรอลอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ จะเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ oxidative pathway และ reductive pathway ซึ่งกระบวนการสร้างสาร 1,3-Propanediol ที่เกิดขึ้นใน reductive pathway จะอาศัยเอนไซม์ vitamin B12 co-enzyme dependent glycerol dehydratase (DhaB) ซึ่งจะไปดึงน้ำออกจากกลีเซอรอลเปลี่ยนเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) จากนั้นเอนไซม์ 1,3-propanediol dehydrogenase (DhaT) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 1,3-Propanediol oxidoreductase (yqhD) จะรีดิวซ์ 3-HPA ได้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ 1,3-Propanediol ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักกลีเซอรอล (Ahrens et al., 1998; Skraly et al., 1998; Maervoet et al., 2011)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม Klebsiella, Clostridia และ Lactobacilli มีกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็น 3-HPA และ 1,3-Propanediol ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงน่าจะมีการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ glycerol dehydratase (DhaB) และ 1,3-Propanediol dehydrogenase (DhaT) ในปริมาณสูง แต่การนำจุลินทรีย์เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมีข้อจำกัด เนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดจัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคและบางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไร้อากาศเท่านั้น (strict anaerobes) ต้องใช้ต้นทุนในการผลิตสูง

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน สามารถเจริญได้เร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนจากต่างสายพันธุ์มากมาย และมีเวคเตอร์ให้เลือกใช้หลายชนิด จึงนิยมใช้เป็นจุลินทรีย์ต้นแบบในการทดลองเกี่ยวกับพันธุกรรมและการดัดแปลงกระบวนการสร้าง

และสลายของเซลล์ในการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ของ *E. coli* ในธรรมชาตินั้นสามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยเอนไซม์ glycerol kinase และ glycerol-3-phosphate dehydrogenase แต่ไม่สามารถผลิต 1,3-Propanediol จากกลีเซอรอลได้ (Przystałowska et al., 2015) โครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการดัดแปลงพันธุกรรมของ *E. coli* โดย การโคลนยีน *dhaT* ที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase จาก *Lactobacilli buchneri* แล้วส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อประยุกต์ใช้การดัดแปลงสายพันธุ์ของ *E. coli* ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อให้สามารถผลิต 1,3-Propanediol จากกลีเซอรอลในอนาคตต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

Lactobacilli buchneri (TISTR 048) สั่งซื้อจากศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Escherichia coli* BL21 (DE3) สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific (USA)

เจริญ *L. buchneri* ในอาหารเหลว de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (de Man et al, 1960) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เจริญในอาหารเหลว Lysogeny broth (LB) *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เจริญในอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37 ºC บ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2. การเพิ่มจำนวนยีน *dhaT*

ทำการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจาก *L. buchneri* ด้วยวิธี Rapid method (Rodriguez et al., 2014) จากนั้นนำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ-มอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้เอนไซม์ KOD One™ PCR master Mix (Toyobo, Japan) และใช้ไพร์-เมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน *dhaT* ดังนี้ *dhaT* forward primer ซึ่งมีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII (ขีดเส้นใต้ตัวหนา) (5′-CGCCG**AAGCTT**ATGAAAGAAAATTTTGATTTTTTAATGCC-3′) และ *dhaT* reverse primer ซึ่งมีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI (ขีดเส้นใต้ตัวหนา) (5′-GGGGCGCT**CGAGCT**ACTTCATGTCATAAGCTTTCTG-3′) โดยทำปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่องพีซีอาร์ทำงานที่อุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้: initial denaturation ที่ 98 ºC เป็นเวลา 30 วินาที denaturation ที่ 90 ºC เป็นเวลา 10 วินาที annealing ที่ 55 ºC เป็นเวลา 5 วินาที extension ที่ 68 ºC เป็นเวลา 5 วินาที ซึ่งจะทำทั้งหมด 35 รอบ และในขั้นสุดท้าย final extension ที่ 68 ºC เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA) ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

3. การโคลนยีน *dhaT* เข้าสู่เซลล์ *E. coli*

นำชิ้นส่วนของยีน *dhaT* และนำเวคเตอร์พาหะ pET-28(a)+ (Novagen, Germany) มาบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII และ XhoI (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามสภาวะที่ระบุไว้ในคู่มือสินค้า จากนั้นนำดีเอ็นเอทั้งสองมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4-DNA ligase (New England Biolabs, USA) และนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธี heat shock (Froger and Hall, 2007) และคัดเลือกเซลล์ลูกผสมโดยการเกลี่ยเชื้อ *E. coli* บนจานอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

4. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *dhaT* ในเซลล์ *E. coli* ลูกผสม

ทำการตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR และ การสกัดพลาสมิดลูกผสมมาวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยในเทคนิค colony PCR นั้นจะนำโคโลนีของเซลล์ *E. coli* ที่ปรากฏบนจานอาหารคัดเลือกจากข้อ 3 มาต้มในน้ำกลั่น 100 µl เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์และปฏิกิริยาเหมือนในข้อ 2

ในการตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดลูกผสมด้วยการสกัดพลาสมิดและตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้น จะนำเซลล์ที่มีผลบวกจาก colony PCR มาเจริญแบบบ่มเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำเซลล์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยชุดสกัด GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII และ XhoI วิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

จากนั้นส่งพลาสมิดลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dhaT* ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

5. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH)

เจริญเซลล์ *E. coli* ลูกผสม และ *E. coli* ที่บรรจุเพียงเวคเตอร์พาหะเปล่า (ชุดควบคุมลบ) ในอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml ที่มี 0.1 mM Isopropyl ß- d-1-thiogalacto pyranoside (IPTG) จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์และล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบด้วย 0.1 M Potassium phosphate buffer จากนั้นแขวนลอยเซลล์ใน 0.1 M Potassium phosphate buffer และนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator โดยตั้งค่า amplitude 30% ใช้ pulse on 10 วินาที สลับกับ pulse off 20 วินาที รวมเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ 1,3-PDH ตามวิธีของ Veiga-da-Cunha (1992)) โดยคร่าวคือ นำส่วนใส ปริมาตร 0.5 ml ผสมกับ 10 mM dithiothreitol (DTT) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตส่วนผสมดังกล่าวมาปริมาตร 50 µl ลงไปผสมใน reaction mixture ปริมาตร 1 ml ที่มี 100 mM-Tris HCl pH 9.0 1 mM Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) และ 155 mM 1,3-Propanediol จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ 340 nm ทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 300 วินาที นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับระยะเวลา โดย 1 หน่วย (Unit, U) ของเอนไซม์เท่ากับปริมาณสาร NADH ที่เกิดขึ้นในหน่วยไมโครโมลาร์ต่อเวลา 1 นาที (µM/min) (Skraly, 1998) การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์เป็นดังสมการ

$$\frac{TV x\ \Delta A x 10^6}{SV x \varepsilon x b}$$

โดย ΔA = ค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อระยะเวลา 1 นาที; TV = ค่าปริมารรวมของสารละลายในหลอดตรวจวัด (ml); SV = ค่าของสารตัวอย่างที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตรวจวัด (ml); b = ค่าความกว้างของคิวเวตที่ใช้ใส่สารละลายตรวจวัด (cm); ε = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของผลลัพธ์หรือสารตั้งต้นที่วัดการดูดกลืนแสง (6.22×10^3 l·mol^{-1}·cm^{-1}) ทำการทดลองตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์รวมทั้งหมด 3 ซ้ำ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การโคลนยีน *dhaT* เข้าสู่ *Escherichia coli*

ยีน *dhaT* จาก *Lactobacillus buchneri* สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (kb) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (รูปที่ 1A) โดยหลังจากเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอของยีน *dhaT* เข้ากับเวคเตอร์พาหะและนำเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* แล้วพบว่ามีเซลล์ลูกผสมซึ่งมียีน *dhaT* อยู่ภายในเซลล์ (รูปที่ 1B และ 1C) โดยในรูป 1B จะเห็นแถบของยีน dhaT เกิดขึ้นเมื่อนำโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารมาเป็นแม่แบบโดยตรงในการทำ PCR ส่วนในรูป 1C จะเห็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบหลังจากการตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII และ XhoI โดยแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.4 kb คือเวคเตอร์พาหะ pET-28(a)+ ซึ่งมีขนาด 5.4 kb และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1-1.2 kb ก็คือชิ้นยีน *dhaT* ที่แยกออกมาจากเวคเตอร์พาหะหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวคเตอร์พาหะนั่นเอง หลังจากได้รับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *dhaT* แล้วนำผลไปสืบค้นลำดับเบสของยีน *dhaT* จากเว็บไซต์ฐานข้อมูลยีนของ NCBI พบว่าขนาดของยีน *dhaT* ซึ่งถอดรหัสให้เอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase จาก *Lacto- bacillus buchneri* NRRL B-30929 (CP002652.1) โดยยีนมีขนาด 1,170 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งยีน *dhaT* ที่ถูกเพิ่มจำนวนในการทดลองนี้มีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *dhaT* ในฐานข้อมูลเช่นกัน

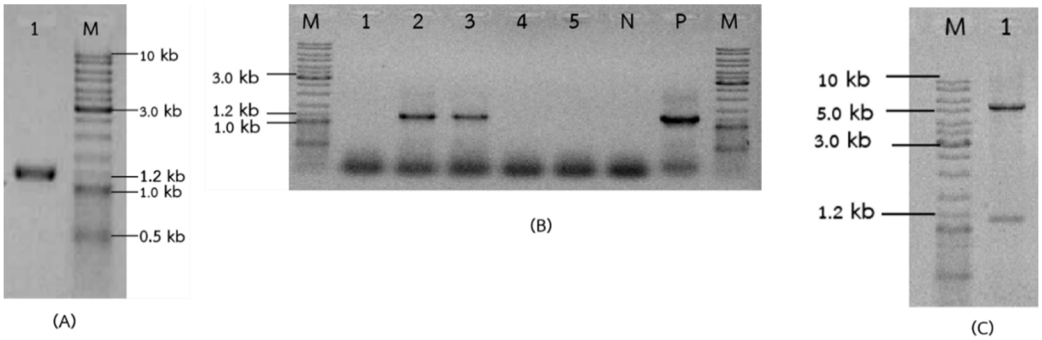
2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นยีน *dhaT* แทรกตัวอยู่ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอด์ของยีน *dhaT* ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนกันอย่างสูงกับยีน *dhaT* ของ *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 (CP002652.1) โดยมีค่าความเหมือน (% max identity) เท่ากับ 99.88% และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้วยโปรแกรม clustal W พบว่าลำดับมีความคล้ายกันอย่างสูง เมื่อนำลำดับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dhaT* เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *dhaT* ด้วยโปรแกรม BlastX พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนกันอย่างสูงกับเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase ของ *Lactoba-*

cillus buchneri NRRL B-30929 CP002652.1 โดยมีค่าความเหมือน (% max identity) เท่ากับ 99.65%

3. กิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH) ใน *Escherichia coli* ลูกผสม

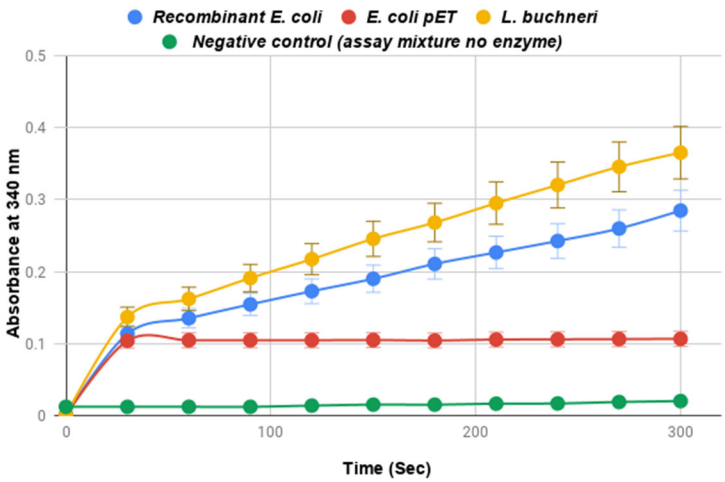
ยีน *dhaT* ที่แทรกตัวอยู่ในพลาสมิดลูกผสมสามารถถอดรหัสให้เอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH) ซึ่งสามารถทดสอบโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-PDH ในเซลล์ *E. coli* ลูกผสมเพื่อยืนยันว่ายีนที่โคลนเข้าไปสามารถแสดงออกและสร้างโปรตีนลูกผสมได้ โดยการวัดการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงของสาร NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm (ดังรูปที่ 2 ซึ่งจากการทดสอบพบว่า *E. coli* ลูกผสมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-PDH เท่ากับ 154.228 mU/ml ในขณะที่ *L. buchneri* วัดค่ากิจกรรมได้ 208.793 mU/ml ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *dhaT* ที่โคลนเข้าไปสามารถแสดงออกเอนไซม์ได้ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-PDH ควรทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลูกผสม 1,3-PDH ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี้ (affinity chromato graphy) เช่น การใช้คอลัมน์ nickel-nitrilo triacetic acid (Ni-NTA) ทำให้สามารถดักจับโปรตีน ลูกผสมซึ่งมีส่วนของฉลากฮิสทิดีน (His-tag) อยู่ ซึ่งผู้วิจัยจะทำการศึกษาในอนาคตต่อไป



รูปที่ 1 (A) แถบดีเอ็นเอยีน *dhaT* ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR

(B) ตัวอย่างผล colony PCR: หมายเลข 1-5 = โคโลนีเดี่ยวแต่ละโคโลนีที่คัดเลือกมาวิเคราะห์, N = negative control (ใช้น้ำกลั่นเป็นแม่แบบ), P = positive control (ใช้ชิ้นดีเอ็นเอของ *dhaT* เป็นแม่แบบ)

(C) การวิเคราะห์พลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 = พลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ XhoI ในทุกรูป M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสงของสาร NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm ซึ่งแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase

ตารางที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH) ของเซลล์แบคทีเรียในงานวิจัยนี้

Strains/Sample	Activity of 1,3-PDH (mU/ml)
Negative control	9.065 ± 0.431
E. coli pET28	33.558 ± 1.529
E. coli pET28+*dhaT*	154.228 ± .667
L. buchneri	208.793 ± 0.557

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *dhaT* และนำเข้าเซลล์ *E. coli* ได้สำเร็จ โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอด์ของยีน *dhaT* ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ายีนที่ได้มีความเหมือน 99.88% กับยีน dhaT ของ *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 (CP002652.1) มีลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกันอย่างสูงกับเอนไซม์ 1,3-Propanediol dehydrogenase (1,3-PDH) ของ *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 (CP00265 2.1) โดยมีค่าความเหมือน 99.65% เมื่อทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ 1,3-PDH พบว่าเอนไซม์ลูกผสมจาก *E. coli* แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ 1,3-PDH แสดงให้เห็นว่ายีน *dhaT* จาก *L. buchneri* สามารถแสดงออกใน *E. coli* ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรติโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Ahrens, K., Menzel, K., Zeng, A. and Deckwer, W. (1998). Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. Biotechnology and Bioengineering 59(5): 544-552.

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. and Deckwer, W. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. Applied Microbiology and Biotechnology 52(3): 289-297.

Fenghuan, W., Huijin, Q., He, H. and Tan, T. (2005). High-Level Expression of the 1,3-Propanediol Oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*. Molecular Biotechnology 31(3): 211-220.

Froger, A. and Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. Journal of visualized experiments (6): 253.

Liu, H., Ou, X., Zhou, S., and Liu, D. (2009). Microbial 1,3-Propanediol, Its Copolymerization with Terephthalate, and Applications. Microbiology Monographs Plastics from Bacteria 405-425.

de Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology (23): 130–135.

Maervoet, V. E., Mey, M. D., Beauprez, J., Maeseneire, S. D. and Soetaert, W. K. (2011). Enhancing the Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol Using Metabolic Engineering. Organic Process Research & Development 15(1): 189-202.

Przystałowska, H., Zeyland, J., Szymanowska-Powałowska, D., Szalata, M., Słomski, R., Lipiński, D. (2015). 1,3-Propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. Microbiological Research 171: 1-7.

Rodríguez, I., Fraga, J., Noda, A. A., Mayet, M., Duarte, Y., Echevarria, E. and Fernández, C. (2014). An Alternative and Rapid Method for the Extraction of Nucleic Acids from Ixodid Ticks by Potassium Acetate Procedure. Brazilian Archives of Biology and Technology 57(4): 542-547.

Skraly, F. A., Lytle, B. L., Cameron, D. C. (1998). Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. Applied and Environmental Microbiology 64: 98-105.

Studier, F. W. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli.* Methods in Molecular Biology 1091: 17-32.

Veiga-da-Cunha, M. and Foster, M. A. (1992). 1,3-Propanediol: NAD^+ oxidoreductases of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri.* Applied and Environmental Microbiology 58(6): 2005-2010.

❑❑❑❑❑