

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซิน
ที่ละลายน้ำได้จาก *Streptococcus suis*
ในระบบการแสดงออกของ *Escherichia coli*



เกษราภรณ์ มีรอด

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซิน
ที่ละลายน้ำได้จาก *Streptococcus suis*
ในระบบการแสดงออกของ *Escherichia coli*



เกษราภรณ์ มีรอด

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

STUDY OF OPTIMAL CONDITIONS TO PRODUCE RECOMBINANT SOLUBLE SUILYSIN
PROTEIN FROM *STREPTOCOCCUS SUI* IN *ESCHERICHIA COLI*
EXPRESSION SYSTEM



KETSARAPORN MEEROD

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Biotechnology
May 2025

Copyright 2025 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซิน

ที่ละลายน้ำได้จาก *Streptococcus suis*

ในระบบการแสดงออกของ *Escherichia coli*

ของ เกษราภรณ์ มีรอด

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภััสสร)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รวิศรา รื่นไวย)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ เนื่องเม็ก)

- เรื่อง:** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซิน
ที่ละลายน้ำได้จาก *Streptococcus suis*
ในระบบการแสดงออกของ *Escherichia coli*
- ผู้วิจัย:** เกษราภรณ์ มีรอด, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2567
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
รวิสรา รื่นไวย
- คำสำคัญ:** ซูไลซิน, โปรตีนละลายน้ำ, *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*

บทคัดย่อ

Streptococcus suis เป็นแบคทีเรียก่อโรคในสุกรที่สามารถติดต่อสู่คนและเป็นสาเหตุของโรคไข้หูดับ
หนึ่งในปัจจัยรุนแรงของเชื้อนี้คือ ซูไลซิน (Sly) ซึ่งเป็นพิษชนิด cholesterol-dependent cytolysin มีบทบาทในการ
ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เชื้อสามารถบุกรุกและก่อโรคได้อย่างรุนแรง ปัจจุบันการรักษาโรคไข้หูดับอาศัยยา
ปฏิชีวนะร่วมกับการประเณินอาการ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีวัคซีนที่สามารถใช้งานได้จริง ในการพัฒนาวัคซีน Sly
ได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นโปรตีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี (highly immunogenic protein) งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสภาวะ
ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซินที่ละลายน้ำได้จาก *S. suis* serotype 2 โดยใช้ระบบการแสดงออกของ
Escherichia coli และกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ผลการทดลองพบว่า *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-Sly สามารถ
ผลิตโปรตีนซูไลซินได้ ซึ่งตรวจสอบโดย Western blot analysis พบแถบโปรตีนขนาด 54 kDa สภาวะที่ให้ผลผลิตดี
ที่สุดคือการเหนี่ยวนำด้วย 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 12
ชั่วโมง การแยกโปรตีนด้วย Histidine tag column chromatography โดยใช้ 80, 100 และ 200 mM imidazole ทำให้ได้
โปรตีนบริสุทธิ์ในปริมาณ 0.60 mg/l การค้นพบนี้แสดงศักยภาพในการนำโปรตีนสายผสมซูไลซินไปใช้สำหรับการ
พัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้หูดับได้ในอนาคต

Title: STUDY OF OPTIMAL CONDITIONS TO PRODUCE RECOMBINANT SOLUBLE SUILYSIN PROTEIN FROM *STREPTOCOCCUS SUIIS* IN *ESCHERICHIA COLI* EXPRESSION SYSTEM

Author: Ketsaraporn Meerod, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2024

Advisor: Assistant Professor Supaporn Passorn Co-advisor Assistant Professor Dr.Rawisara Ruenwai

Keywords: Suilysin Soluble protein Escherichia coli Streptococcus suis

ABSTRACT

Streptococcus suis is a pathogenic bacterium in pigs that can be transmitted to humans, causing Streptococcal toxic shock-like syndrome (STSS), commonly known as streptococcal meningitis or “pig ear disease”. One of the major virulence factors of this bacterium is suilysin (Sly), a cholesterol-dependent cytolysin that plays a crucial role in membrane disruption, facilitating bacterial invasion and increasing disease severity. Currently, treatment for *S. suis* infection relies on antibiotic therapy along with clinical symptom evaluation. However, there is no available vaccine for effective prevention. In vaccine development, Sly has gained attention due to its strong immunogenic properties (highly immunogenic protein), making it a promising candidate for future vaccine research. This study aimed to determine the optimal conditions for producing recombinant soluble suilysin protein from *S. suis* serotype 2 using an *Escherichia coli* expression system, followed by protein purification. Experimental results demonstrated that *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-Sly successfully expressed suilysin protein, as confirmed by Western blot analysis, revealing a 54 kDa target protein band. The highest protein yield was obtained under induction with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 28°C for 12 hours. Protein purification using Histidine tag column chromatography with 80, 100 and 200 mM imidazole resulted in a purified protein yield of 0.60 mg/l. These findings showed the potential of using recombinant suilysin protein for future vaccine development to protect STSS.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร อาจารย์ที่ปรึกษาวิจัย และ ดร.วนิดา อภินาพงศ์ ที่ได้ชี้แนะและติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัยทำให้บรรลุผลสำเร็จได้อย่างราบรื่น ตั้งแต่เริ่มกระบวนการวิจัยตลอดจนดำเนินการเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกขอบคุณในความกรุณาของอาจารย์อย่างยิ่งและขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รวิศรา รื่นไวย์ ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะ และแนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยาทุกท่านที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ทางวิชาการ และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย ซึ่งเป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยาที่อำนวยความสะดวก เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จ ที่คอยเป็นแรงสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจจะศึกษาและนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดในอนาคต

เกษราภรณ์ มีรอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
สเตรปโตค็อกคัส ซูอิส (<i>Streptococcus suis</i>).....	5
ซูลิซิน (Suilysin, Sly).....	9
ยีนก่อโรคที่เกี่ยวข้อง (Virulence factors)	12
แนวทางการรักษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
เทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology)	17
การผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำ (Soluble expression protein)	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
วัสดุและอุปกรณ์	28
วิธีดำเนินงานวิจัย	31

1. การตรวจสอบ Suilysin gene ใน recombinant plasmid vector.....	31
2. การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ในระบบการ แสดงออกของ <i>E. coli</i>	39
3. การศึกษาอัตราการเจริญของ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) และ <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pET28α- sly ที่เติมและไม่เติม 0.8% กลูโคส	40
4. การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำ ได้	40
5. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้	41
6. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้	42
7. การศึกษาผลของการเติม signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly	42
8. การทำโปรตีนบริสุทธิ์	42
9. การวัดปริมาณโปรตีน.....	43
10. การตรวจสอบคุณภาพโปรตีน	45
11. การตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนด้วย Western blot analysis	46
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	48
การตรวจสอบ Suilysin gene ใน recombinant plasmid vector.....	48
การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ ในระบบการแสดงออกของ <i>E. coli</i> ...	54
การศึกษอัตราการเจริญของ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) และ <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pET28α-sly ที่ เติมและไม่เติมกลูโคส.....	55
การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้....	56
การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้.....	58
ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้.....	59
ศึกษาผลของการเติม signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้.....	61
การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	62
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	64

ข้อเสนอแนะ.....	67
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	74
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	75
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	76
ประวัติผู้วิจัย.....	78



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 แสดงยาปฏิชีวนะและกลไกการออกฤทธิ์	20
ตาราง 2 ระบบแสดงออกในโพรคาริโอต	21
ตาราง 3 ระบบแสดงออกในยูคาริโอต	21
ตาราง 4 ปฏิกริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด.....	36
ตาราง 5 ปฏิกริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด.....	37
ตาราง 6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Polymerase chain reaction	38
ตาราง 7 สภาวะที่ใช้ในการทำ Polymerase chain reaction.....	39
ตาราง 8 แสดงตัวอย่างที่มีการเติมสารเหนี่ยวนำ IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	41
ตาราง 9 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน	45
ตาราง 10 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE	46
ตาราง 11 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้จากสูตรอาหารที่มีการเติมและไม่เติม กลูโคสต่อระยะเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง	54
ตาราง 12 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้จากการเติมสารเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น แตกต่างกันเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน	57
ตาราง 13 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลาเทียบกับกราฟโปรตีน มาตรฐาน	58
ตาราง 14 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ในแต่ละอุณหภูมิเทียบกับกราฟโปรตีน มาตรฐาน	60
ตาราง 15 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ในการทดลองการเติม signal peptide เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน.....	61
ตาราง 16 การคำนวณหาปริมาณโปรตีน Sly ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	63

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>S. suis</i> A1: เชื้อที่ขึ้นบนอาหารที่มีเลือดเป็นส่วนประกอบ และ A2: แสดงการย้อมแกรมและลักษณะการจัดเรียงตัวของ <i>S. suis</i>	6
ภาพ 2 แสดงข้อมูลการรายงานไอโซเลทของเชื้อ <i>S. suis</i> ที่แยกได้จากมนุษย์และสุกร ในประเทศไทย	7
ภาพ 3 การกระจาย <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 ที่สำคัญที่สุดทั่วโลกที่แยกได้จากสุกรทางคลินิกและกรณีการติดเชื้อในมนุษย์	8
ภาพ 4 โครงสร้างโดยรวมของ Sly A: แบบจำลองพื้นผิวโมเลกุลของโครงสร้างผลึก Sly 3D, B: Domain 3 รูปแผนภาพและตำแหน่งสัมพัทธ์ของไซต์การกลายพันธุ์ P353L และ C: แผนภาพของแผ่นงาน β -sheet ของ Domain 4	10
ภาพ 5 การสร้างรูบนพรมบนเมมเบรนของโปรตีน Sly จากซ้ายไปขวาโดยโมโนเมอร์จับกันเป็นโอลิโกเมอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการก่อตัวของ oligomeric ring หรือ arc-shaped prepare complex จากนั้นจะยุบตัวลงโดยมี β -hairpins คลื่นออกและสอดเข้าไปใน lipid bilayer และไขมันจะถูกขับออกมา	11
ภาพ 6 กลไกการหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์	15
ภาพ 7 แสดงภาพการ cloning ในแบคทีเรีย	19
ภาพ 8 Operon และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมบนโครโมโซมของ <i>E. coli</i>	22
ภาพ 9 การผลิตโปรตีนในระบบ operon, A: การทำงานของ operon ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาลแลคโตส และ B: การทำงานของ operon ในสถานะที่มีน้ำตาลแลคโตส	23
ภาพ 10 แผนภาพ pET28a vector	27
ภาพ 11 แผนภาพแสดง recombinant plasmid vector A : pET28a-pelB-Sly และ B : pET28a-Sly	33
ภาพ 12 การตรวจสอบ plasmid DNA ด้วย 0.7% Agarose gel electrophoresis Marker: λ -DNA HindIII DNA marker, 1: pET28a-pelB-Sly Colony 4, 2: pET28a-Sly Colony 14 และ 3: pET28a Colony 9	49

ภาพ 13 การตรวจสอบ plasmid DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์เดียว	49
ภาพ 14 การตรวจสอบ plasmid DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์คู่.....	50
ภาพ 15 การตรวจสอบ plasmid DNA ด้วยเทคนิค PCR และ 1% Agarose gel electrophoresis	50
ภาพ 16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Sly แบบต้นแบบ (Sly-Original sequence) และแบบที่มีการดัดแปลงให้มี Codon usage เหมาะกับการแสดงออกใน E. coli (Sly-Codon usage) โดยเว้นวรรคทุก ๆ 10 นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจะเป็นช่องว่าง ส่วนที่เหมือนกันจะมีไฮไลต์ตามสีของแต่ละนิวคลีโอไทด์ A T C G สีเขียว สีแดง สีน้ำเงิน และสี ดำ ตามลำดับ.....	53
ภาพ 17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Sly ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบต้นฉบับ (Sly-Original sequence amino acid) และแบบที่มีการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มี Codon usage เหมาะกับการแสดงออกใน E. coli (Sly-Codon usage amino acid) * : stop codon.....	53
ภาพ 18 การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ของ pET28a-Sly ที่อยู่ใน E. coli	55
ภาพ 19 กราฟแสดงอัตราการเจริญของเซลล์ E. coli BL21 (DE3) และ E. coli BL21 (DE3)-pET28a-sly ในอาหารสูตร 2xYT ที่เติมและไม่เติม 0.8% กลูโคส	56
ภาพ 20 ผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly	57
ภาพ 21 การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly	59
ภาพ 22 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโปรตีน Sly ของ pET28a-Sly	60
ภาพ 23 ศึกษาผลของการเติม signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly.....	62
ภาพ 24 การแยกโปรตีน Sly ให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ FF Column 12.5% SDS-PAGE (A และ B) และ Western blot analysis	63

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Streptococcus suis เป็นแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในสุกรที่เป็นสาเหตุของ Streptococcosis ก่อให้เกิดอาการปอดบวม ข้ออักเสบ (Li, et al., 2021) หลอดลมอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และติดเชื้อในกระแสเลือด แหล่งที่อยู่ของเชื้อพบได้ในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบน (ต่อมทอนซิล เพดานปาก โปรงจมูก) (Benga, et al., 2008) และ (Li, et al., 2021) ระบบทางเดินอาหาร และอวัยวะเพศของสุกร (Segura, 2015) โดยเฉพาะการติดเชื้อส่วนใหญ่พบในลูกสุกรช่วงอายุ 3 – 12 สัปดาห์ (Li, et al., 2021) ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนย้ายสุกร การเลี้ยงสุกรที่มีสุขภาพดีรวมกับสุกรพาหะ โรงเรือนที่มีความแออัด การระบายอากาศไม่เหมาะสม ความชื้น อาหาร และน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (Gottschalk, 2024) นอกจากนี้ *S. suis* ยังถือเป็นเชื้อก่อโรคจากสัตว์สู่คน (zoonotic agent) โดยมีช่องทางการติดเชื้อผ่านระบบทางเดินหายใจ การสัมผัสสัมผัสกับสุกรที่ติดเชื้อ หรือการบริโภคเนื้อหมูดิบ (Takeuchi, et al., 2013) อาการทางคลินิกที่พบในคน ได้แก่ ไข้ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน การอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง ข้ออักเสบ เยื่อหุ้มช่องท้องอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ และเมื่อเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด อาจก่อให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือภาวะช็อก รวมถึงภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น ภาวะหูดับ และการทำงานของระบบทรงตัว (Segura, 2015) ระยะฟักตัวของโรคอยู่ระหว่าง 2 – 3 ชั่วโมงจนถึง 14 วัน (Singpolatan, 2019) ทั้งนี้ ความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อ ชนิด Serotype และปัจจัยการสร้างโปรตีน Supernatant ของเชื้อ (Suriya, et al., 2019) ปัจจุบัน *S. suis* มีทั้งหมด 29 serotypes อ้างอิงจากความแตกต่างของแอนติเจนบนผิวแคปซูล (Capsular polysaccharides, CPS) (Gottschalk, 2024) ในปี ค.ศ. 2013 มีรายงานการติดเชื้อในมนุษย์ทั่วโลกมากถึง 1,642 ราย โดยภูมิภาคที่มีการระบาดส่วนใหญ่ ได้แก่ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก โดยพบผู้ป่วย 83.6% ในเวียดนาม ไทย และจีน (Tenenbaum, et al., 2016 และ Li, et al., 2021) ซึ่งมีรายงานผู้ติดเชื้อในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 – 2021 พบว่ามีการติดเชื้อในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ถึง 76.6 % การติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากการรับประทานสุกรแบบปรุงไม่สุก 61.4% ซึ่งอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบพบมากถึง 40.8% โดยมีอัตราการเสียชีวิต 12.1% ชนิดที่แยกได้จากผู้ป่วย

ในประเทศไทยคือ serotype 2 มากถึง 93.4% และได้หาความจำเพาะโดยใช้เทคนิค Multilocus sequence type พบการระบาดใน Sequence Type 1 (ST1) และ Sequence Type 104 (ST104) (Kerdsin, 2022) ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ ได้แก่ Suilysin (Sly), Extracellular factor (EF), Muramidase-released protein (Mrp) และ Capsule polysaccharides (Lun, et al., 2007) จากรายงานของ Zheng, et al., (2009) ศึกษาโรคในสมองส่วน Cerebellar ของสุกรจากการติดเชื้อ *S. suis* serotype 2 โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry พบการสะสมของเชื้อ *S. suis*, โปรตีน Sly และเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณเดียวกัน ซึ่งบ่งชี้ว่า Sly อาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ

Suilysin เป็นพิษชนิด Cholesterol-dependent cytolysin (CDC) ที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็นคอเลสเตอรอลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเซลล์เป้าหมายประกอบด้วย เซลล์เยื่อบุผิว เซลล์บุผนังหลอดเลือด นิวโทรฟิล (Neutrophils) และ มาโครฟาจ (Macrophages) (Takeuchi, et al., 2013) พิษของ Sly มีบทบาทสำคัญในการสร้างรูพรุนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลต่อความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่กระแสเลือดของเชื้อ และเพิ่มความรุนแรงของโรค (Tenenbaum, et al., 2016) การศึกษาจาก Takeuchi, et al., (2013) ได้เปรียบเทียบปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงทางคลินิกระหว่าง *S. suis* serotype 2 ใน ST1 และ ST104 พบว่าแม้ทั้งสองสายพันธุ์สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ แต่สายพันธุ์ ST1 มีแนวโน้มก่อให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมด้วย ทั้งนี้ สายพันธุ์ ST1 มีการแสดงออกของยีน Sly ในระดับสูงกว่า ST104 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การศึกษายีน Sly จาก *S. suis* ที่แยกได้จากสุกรที่มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด พบว่ายีน Sly มีการแสดงออกสูงถึง 95% ใน serotype 2 และ 69.4% ในไอโซเลทจาก serotype อื่น ๆ จำนวน 10 serotypes (Tenenbaum, et al., 2016) จากรายงานของ He, et al., (2014) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตโปรตีน Sly ใน *S. suis* สายพันธุ์ 05ZYH33 ที่มี Sly แบบปกติ และสายพันธุ์ 1904 ที่ยีน Sly ถูกทำให้เป็น nonpolar mutant โดยพบว่าสายพันธุ์ 1904 มีการผลิต Sly ลดลง ความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สะท้อนให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ Sly ในกระบวนการก่อโรคและเพิ่มความรุนแรงของการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิต

ปัจจุบันการรักษาการติดเชื้อ *S. suis* ในสัตว์เน้นการรักษาตามอาการร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะ (Gottschalk, et al., 1991) และยังไม่มีวัคซีนสำหรับมนุษย์ที่สามารถนำมาใช้ได้จริง (Lun, et al., 2007) การรักษาในมนุษย์ส่วนใหญ่ใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam (Gottschalk, 2024) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการดื้อต่อยา Penicillin และยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ของ *S. suis* เพิ่มขึ้น (Lun, et al., 2007) ซึ่งส่งผลให้มีความพยายามในการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการ

ติดเชื้อและหนึ่งในแนวทางที่มีศักยภาพสูงคือการใช้โปรตีน Sly ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Highly Immunogenic Protein (Tenenbaum, et al., 2016) จากงานวิจัยของ Jacobs, et al., (1994) แสดงให้เห็นว่าการฉีดโปรตีน Sly บริสุทธิ์เข้าสู่หนูทดลองสามารถป้องกันการติดเชื้อ *S. suis* serotype 2 ได้อย่างสมบูรณ์และโปรตีนดังกล่าวยังอาจมีศักยภาพในการเป็นปัจจัยป้องกันข้ามสายพันธุ์ (Cross-protection factor) ในการทดลองเพิ่มเติมของ Wu, et al., (2022) ได้ประเมินบทบาทของ Sly ในการเสริมฤทธิ์วัคซีนโดยใช้โปรตีนพิษจาก *Pasteurella multocida* ที่ถูกดัดแปลงเป็นแอนติเจน (rPMT-NC) เปรียบเทียบกับสารเสริมฤทธิ์ดั้งเดิม เช่น Aluminum hydroxide และ Water-in-oil-in-water พบว่าหนูที่ได้รับวัคซีน rPMT-NC ร่วมกับ Sly มีการผลิตแอนติบอดีในซีรัมและกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในระดับสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารเสริมฤทธิ์ตัวอื่น โดยมีอัตราการรอดชีวิตถึง 70% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวัคซีน rPMT-NC เพียงอย่างเดียว ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า Sly สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อในหนูทดลอง ทั้งยังช่วยเพิ่มระดับแอนติบอดีในซีรัมและเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (vaccine adjuvant) ได้อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ด้วยระบบการแสดงออกของ *Escherichia coli* เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวัคซีนหรือสารเสริมฤทธิ์วัคซีนในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซินในรูปแบบที่ละลายน้ำได้จากเชื้อ *Streptococcus suis* serotype 2 ในระบบการแสดงออกของ *Escherichia coli* และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการแสดงออกของยีน เพื่อผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซินในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ โดยใช้ระบบการแสดงออกของ *E. coli* ซึ่งยีน Sly ที่นำมาศึกษา เป็นยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *S. suis* serotype 2 โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ และนำโปรตีนที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Histidine tag affinity column chromatography

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบขั้นตอนการผลิตโปรตีนสายผสมซูไลซินในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ และขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อนำโปรตีนที่ผลิตได้ไปศึกษาด้านภูมิคุ้มกันวิทยาต่อในอนาคต สำหรับพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับรักษาโรคไข้หัด หรือสารเสริมฤทธิ์วัคซีนในอนาคต



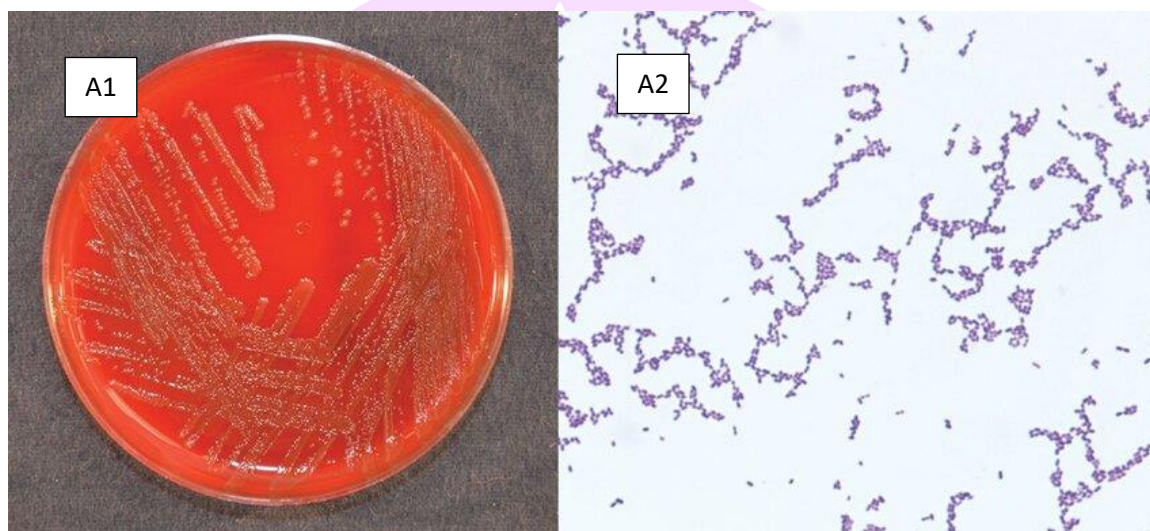
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สเตรปโตค็อกคัส ซูอิส (*Streptococcus suis*)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการจัดเรียงตัวแบบคู่หรือสายโซ่สั้น ๆ (ภาพที่ 1) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะ Facultative anaerobe โดยสายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็น alpha-hemolytic (Takeuchi, et al., 2013 และ Goyette-Desjardins et al., 2014) สายพันธุ์นี้ถูกจัดจำแนกออกเป็น serotype ตามความแตกต่างของแอนติเจนบนแคปซูล ซึ่งปัจจุบันมี 29 serotypes หลังจากการจำแนกใหม่ที่ยกเว้น *S. parasuis* (serotype 20, 22, และ 26), *S. orisratti* (serotype 32 และ 34) และ *S. ruminantium* (serotype 33) (Segura, 2015 และ Gottschalk, 2024) การตรวจสอบ serotype สามารถทำได้ผ่านเทคนิค Serological, PCR และ Molecular methods โดย *S. suis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินหายใจส่วนบน เช่น ต่อมทอนซิล โพรงจมูก และเพดานปาก รวมถึงระบบทางเดินอาหารและอวัยวะเพศของสุกร (Benga, et al., 2008, Li, et al., 2021 และ Segura, 2015) เชื้อก่อโรคนี้นี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมสุกร โดยสามารถก่อให้เกิดโรค streptococcosis ซึ่งอาการทางคลินิกหลายรูปแบบ ได้แก่ ข้ออักเสบ หลอดลมอักเสบ เยื่อปอดอักเสบอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยเฉพาะในลูกสุกรที่มีอายุระหว่าง 3 – 12 สัปดาห์ (Li, et al., 2021) ปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนย้ายสุกร การเลี้ยงสุกรที่มีสุขภาพดีร่วมกับสุกรพาหะ การเลี้ยงในโรงเรือนที่แออัด การระบายอากาศที่ไม่เหมาะสม รวมถึงอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (Gottschalk, 2024) นอกจากนี้ *S. suis* ยังเป็นแบคทีเรียก่อโรคสู่คน (zoonotic agent) โดยการติดเชื้อสามารถเกิดขึ้นผ่านหลายช่องทาง ได้แก่ การสัมผัสกับสุกรที่มีเชื้อผ่านบาดแผล ระบบทางเดินหายใจ และการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ปรุงไม่สุก (Takeuchi, et al., 2013) การติดเชื้อในมนุษย์อาจก่อให้เกิดโรคที่รุนแรง แบ่งได้สองแบบคือ 1. รูปแบบเยื่อหุ้มสมองอักเสบเฉียบพลัน (Purulent meningitis) ได้แก่ ไข้สูง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ สูญเสียการได้ยิน เดินไม่ตรง โคม่า คอแข็ง จุดเลือดออกใต้ผิวหนัง ปวดข้อ อัมพาตรอบนอกและใบหน้า และปวดกล้ามเนื้อ 2. รูปแบบช็อกจากการติดเชื้อเฉียบพลัน (Toxic septic shock) ได้แก่ ความดันโลหิตต่ำ อัตราการเต้นหัวใจสูง การทำงานของตับผิดปกติ เลือดแข็งตัว ภาวะไตวายเฉียบพลัน และภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (Lun, et al., 2007) ระยะฟักตัวของเชื้ออยู่ที่

2 – 3 ชั่วโมง ถึง 14 วัน ซึ่งผู้ติดเชื้อจะมีการแตกต่างกันในแต่ละบุคคลขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของ serotype ปริมาณเชื้อที่ได้รับ และการสร้าง superantigen ของเชื้อ โดยผู้ป่วยที่แสดงอาการทางคลินิกจะมีอัตราการเสียชีวิต 28 % และผู้ป่วยที่มีการช็อคจากการติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิต 80 % (Singpolatan, 2019 และ Suriya, et al., 2019) โดยมีปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อหลัก ๆ ได้แก่ Suilysin, Extracellular factor, Muramidase-released protein และ Capsule polysaccharides (Lun, et al., 2007)

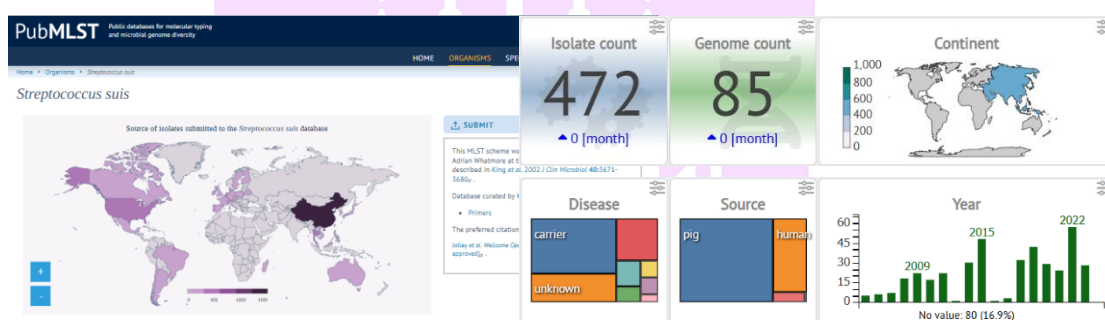


ภาพ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. suis* A1: เชื้อที่ขึ้นบนอาหารที่มีเลือดเป็นส่วนประกอบ และ A2: แสดงการย้อมแกรมและลักษณะการจัดเรียงตัวของ *S. suis*

ที่มา: Gomez, et al., 2014

S. suis พบการระบาดในคนครั้งแรกที่ประเทศเดนมาร์ก ในปี ค.ศ. 1968 หลังจากนั้น มีรายงานการติดเชื้อเพิ่มขึ้นในทวีปยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย (Singpolatan, 2019) ซึ่งในปี ค.ศ. 2013 เกิดการติดเชื้อทั่วโลกมากถึง 1,642 ราย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดในภูมิภาคเอเชีย ตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึง 83.6 % ในประเทศเวียดนาม ไทย และจีน (Tenenbaum, et al., 2016) ในปี ค.ศ. 2002 ได้มีการสร้าง Multilocus sequence typing model ขึ้นเพื่อจัดจำแนกรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อ *S. suis* จากห้องปฏิบัติการทั่วโลกที่ระบุถึงความแตกต่างกันของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดความรุนแรง (virulence associated markers) ได้แก่ Sly gene, Muramidase-released protein, Extracellular factor และ pili ในปี ค.ศ. 2015 พบการรายงานลักษณะที่มีความแตกต่างกันของทุก serotype มากถึง 600 STs บ่งชี้ได้ว่า

ความแปรปรวนทาง genotype phenotype และลักษณะทางภูมิศาสตร์ส่งผลให้มีความแตกต่างภายใน serotype เดียวกัน ซึ่งการกระจายตัวของ *S. suis* ในมนุษย์และสุกร จากตัวอย่าง 4,500 serologically ในช่วง 12 ปีที่ผ่านมา serotype ของ *S. suis* ที่พบมากที่สุดจากกรณีทางคลินิกในสุกร ได้แก่ serotype 2, 9, 3, 1/2 และ 7 ตามลำดับ และอีก 15.5% ไม่สามารถระบุ serotype ได้ และสำหรับการติดเชื้อในมนุษย์พบว่า serotype 2 เป็น serotype ที่มีรายงานพบมากที่สุด รองลงมาคือ serotype 14, 4, 5, 9, 16, 21 และ 24 ตามลำดับ (Segura, 2015) และประเทศไทยยังคงมีการรายงานการติดเชื้อในทุก ๆ ปี (ภาพที่ 2) จากสถานการณ์ล่าสุดจากกรมระบาดวิทยาในปี ค.ศ. 2023 พบผู้ป่วยจำนวน 548 ราย เสียชีวิต 26 ราย ซึ่งจำนวนทั้งผู้ป่วยและผู้ติดเชื้อสูงกว่าปี ค.ศ. 2022 ที่ผ่านมา (กรมระบาดวิทยา, มปป)

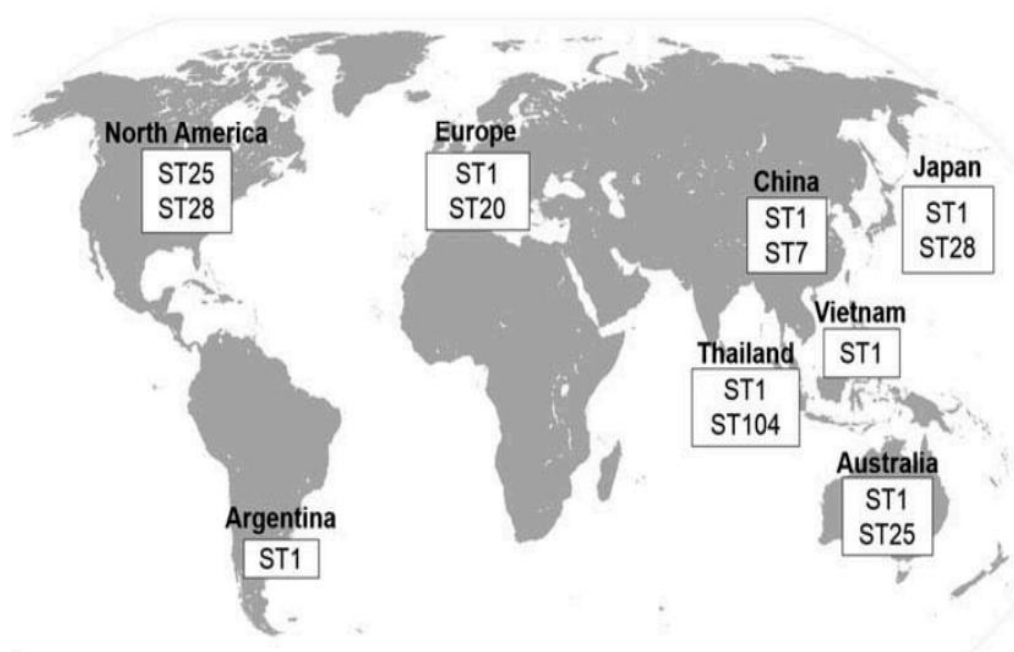


ภาพ 2 แสดงข้อมูลการรายงานไอโซเลทของเชื้อ *S. suis* ที่แยกได้จากมนุษย์และสุกรในประเทศไทย

ที่มา: Retrieved from <https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>

Streptococcus suis serotype 2 เป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรงที่สุดและตรวจพบได้มากที่สุดทั่วโลกที่แยกได้จากทั้งสุกรและมนุษย์ จากภาพที่ 3 พบว่าการระบาดของ serotype 2 มีความแตกต่างทาง ST ของแต่ละภูมิภาค (Segura, 2015) ซึ่งจากรายงานของ Takeuchi, et al., (2013) ศึกษาปัจจัยที่มีความรุนแรงทางคลินิกที่แตกต่างกันของ *S. suis* serotype 2 ST1 ที่มีการระบาดทั่วโลก และ ST104 ที่มีการระบาดในประเทศไทย โดยพบว่าทั้งสอง ST จะมีส่วนที่คล้ายคลึงกันใน serotype 2 แต่ ST1 มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมด้วยในขณะที่ ST104 ไม่มี ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ST1 มีการแสดงออกของ Sly ในปริมาณที่สูงกว่า ST104 ซึ่ง Sly อาจมีส่วนร่วมต่อการอักเสบและอัตราการเสียชีวิตที่สูงขึ้น จากรายงาน ของ Zheng, et al., (2009) ศึกษาโรคในสมองส่วน Cerebellar ของสุกรที่มีการติดเชื้อ *S. suis* serotype 2 โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry พบว่ามีการอักเสบของสมองและเยื่อหุ้ม (meningoencephalitis)

ในบริเวณเดียวกันมีแบคทีเรีย Sly และเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งระบุว่า Sly อาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ทั้งนี้ *S. suis* serotype 2 ถูกรายงานถึงการแสดงออก Sly สูง โดยมีความรุนแรงของโรคมมากกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ Sly ต่ำ (Gottschalk, 2024) สอดคล้องกับรายงานของ He, et al., (2014) ศึกษาการผลิตโปรตีน Sly ของ *S. suis* serotype 2 สายพันธุ์ 05ZYH33 พบว่ามีการผลิต Sly สูงถึง 1.49 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับ *S. suis* สายพันธุ์ 1904 (nonpolar mutant ของยีน Sly) ผลิต Sly เพียง 0.33 $\mu\text{g/ml}$ การทดลองนี้พบว่าผลของการกลายพันธุ์ของยีน Sly ทำให้มีการติดเชื้อลดลง ซึ่ง Sly อาจมีบทบาทในการเจาะเยื่อหุ้มเซลล์ และอัตราการบุกรุกที่สูงขึ้นทำให้เพิ่มระดับความรุนแรงในการเกิดโรคมมากขึ้น



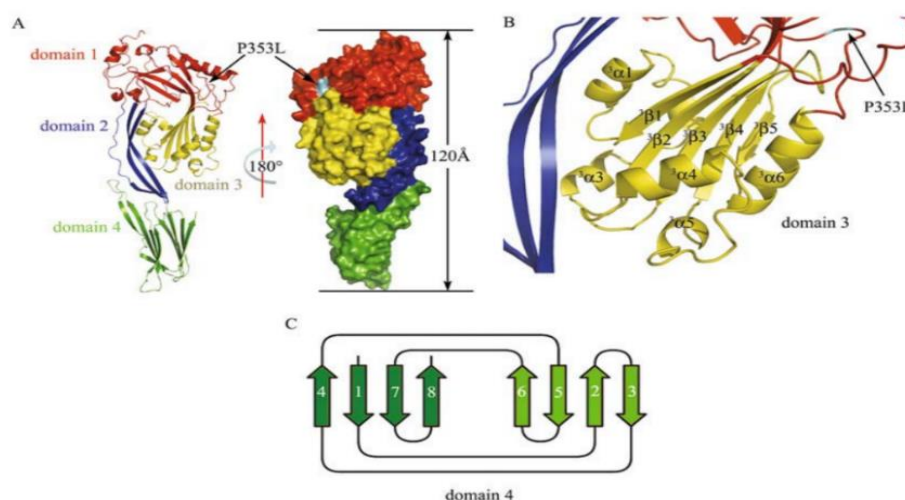
ภาพ 3 การกระจาย *Streptococcus suis* serotype 2 ที่สำคัญที่สุดทั่วโลกที่แยกได้จาก
สุกรทางคลินิกและกรณีการติดเชื้อในมนุษย์

ที่มา: Segura, 2015

ซูไลซิน (Suilysin, Sly)

Suilysin (Sly) เป็นโปรตีนที่ถูกหลั่งออกนอกเซลล์ในรูปแบบโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถละลายน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 กิโลดาลตัน (kDa) และประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 497 ตัว (Tenenbaum, et al., 2016) โปรตีนนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารพิษที่เรียกว่า Cholesterol-dependent cytolytic toxins (CDCs) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยอาศัยการจับกับคอเลสเตอรอลที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์โดยเซลล์เป้าหมายที่ถูกทำลาย ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิว เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์นิวโทรฟิล (neutrophils) และเซลล์มาโครฟาจ (macrophages) (Takeuchi, et al., 2013) ในอดีต กลุ่ม CDCs เคยถูกเรียกว่า Thiol-activated cytolytic toxins (TACY) เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้มีกรดอะมิโน cysteine หนึ่งตำแหน่งในลำดับกรดอะมิโนช่วง undecapeptide ซึ่งเชื่อว่ามีบทบาทสำคัญต่อการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์และการออกฤทธิ์ของสารพิษ อย่างไรก็ตาม การออกซิไดซ์หมู่ซัลไฮดริลของ cysteine อาจทำให้สารพิษสูญเสียฤทธิ์ แต่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้เมื่อพันธะไดซัลไฟด์ถูกสลาย อย่างไรก็ตามยังมีสมาชิกบางชนิดในกลุ่ม CDCs เช่น pyolysin และ intermedilysin ที่ไม่มี cysteine ในตำแหน่งดังกล่าว โดยมีกรดอะมิโน alanine แทน และยังคงความสามารถในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ตามปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cysteine อาจไม่จำเป็นต่อการทำงานของโปรตีนกลุ่มนี้ และเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้มีการยกเลิกการใช้ชื่อ TACY ในเวลาต่อมา (Tenenbaum, et al., 2016) CDCs เป็นกลุ่มของสารพิษที่มีความสามารถในการสร้างรูในเยื่อหุ้มเซลล์ (pore-forming toxins) ซึ่งกลไกการทำงานสำคัญของโปรตีนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับโครงสร้างบริเวณปลายสายโปรตีนด้าน C (C-terminal domain) โดยเฉพาะในโดเมนที่ 4 (Domain 4, D4) ซึ่งมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่เรียกว่า undecapeptide tryptophan-rich motif (Xu, et al., 2010) ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ undecapeptide นี้ประกอบด้วย 11 ตัว ได้แก่ ECTGLAWWWWR ซึ่งอุดมไปด้วยกรดอะมิโน tryptophan (W) ซ้ำหลายตำแหน่ง (Tenenbaum, et al., 2016) โดยมีบทบาทสำคัญในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีคอเลสเตอรอลสูง โดย tryptophan ช่วยเพิ่มความสามารถในการปฏิสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Soltani, et al., 2007) โครงสร้างของ CDC ประกอบด้วยปลาย N (N-terminal domains) Domain 1 (D1) และ Domain 3 (D3) Domain 2 (D2) เชื่อมต่อกับ Domain 4 (D4) ที่อยู่บริเวณ C-terminal โดย Sly ประกอบด้วย β -strand มีลักษณะ rod-like-shape มีขนาด $40 \text{ \AA} \times 53 \text{ \AA} \times 120 \text{ \AA}$ 43% ตั้งแต่ 5–31 กรดอะมิโน และอีก 14% ประกอบด้วย α -helix จำนวน 10 เส้น มีความยาวตั้งแต่ 4 – 16 กรดอะมิโน โครงสร้างของ D1 ประกอบด้วย กรดอะมิโนช่วง 32–48, 85–175, 226–271 และ 347–370 มีโครงสร้างแบบ antiparallel β -sheet จำนวน 6 แผ่น และมี α -

helix ที่ยาวที่สุดกรดอะมิโนในช่วง 147–16 มีตำแหน่งกลายพันธุ์ (point mutation) อยู่ที่ residue 353, D2 ประกอบด้วย mix β -sheet จำนวน 3 แผ่น ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่าง D1 และ D3 กับ D4 ลำดับกรดอะมิโนช่วง 49–84 และ 371–387, D3 มีลักษณะโครงสร้างแบบ sandwich-shaped (global $\alpha / \beta / \alpha$ domain) ชั้นกลางประกอบด้วย antiparallel β -sheet จำนวน 5 แผ่น และชั้นบน-ล่างประกอบด้วย α -helices จำนวน 3 แผ่น กรดอะมิโน ช่วง 176–225 และ 272–346 และ D4 มีโครงสร้างแบบ β sandwich fold ประกอบด้วย β -sheet จำนวน 2 แผ่น เรียกว่า topology (ภาพที่ 4.3) กรดอะมิโน ช่วง 388–497 และบริเวณ อะมิโนที่ 410–418 และ 422–446 มีบทบาทในการสร้างห่วงกับ D2 (hydrophobic core) (ภาพที่ 4) (Xu, et al., 2010)

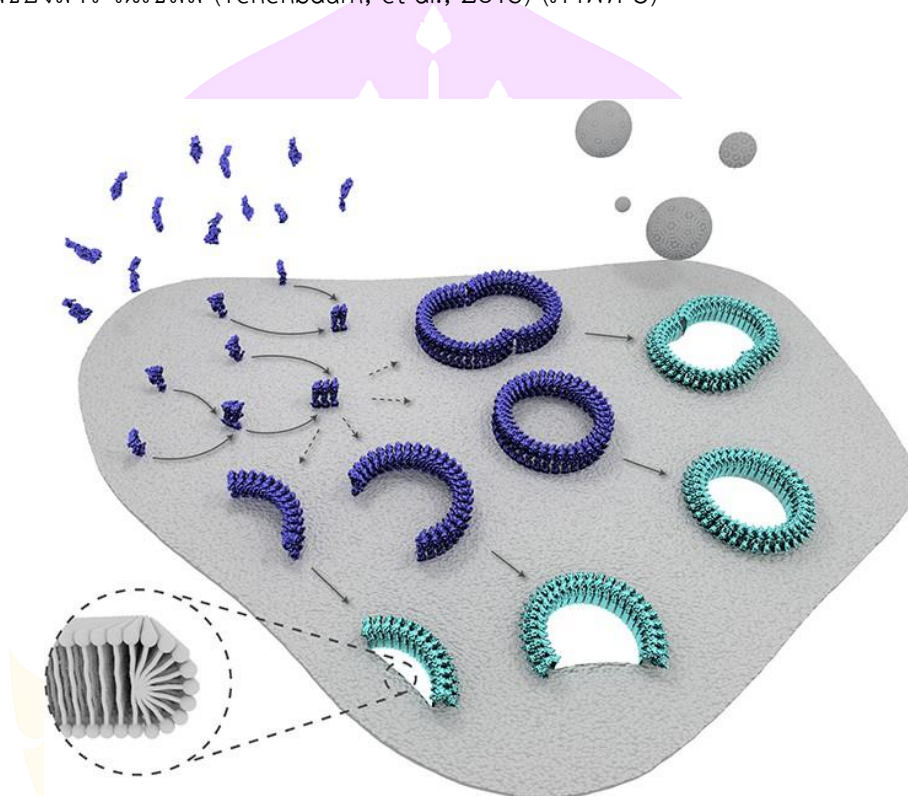


ภาพ 4 โครงสร้างโดยรวมของ Sly A: แบบจำลองพื้นผิวโมเลกุลของโครงสร้างผลึก Sly 3D, B: Domain 3 รูปแผนวิซและตำแหน่งสัมพัทธ์ของไซต์การกลายพันธุ์ P353L และ C: แผนภาพของแผ่นงาน β -sheet ของ Domain 4

ที่มา: Xu, et al., 2010

กลไกการสร้างรูพรุนของ Sly โมนิเมอร์ของ Sly จะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีคอเลสเตอรอลสูง โดยใช้ undecapeptide ที่อยู่ใน D4 ซึ่งช่วยให้โมนิเมอร์สามารถยึดเกาะและแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มได้หลังจากที่ Sly จับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใน D3 เรียกว่า conformational coupling ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับเยื่อหุ้มเซลล์ แต่มีผลทำให้โมนิเมอร์ของโปรตีน Sly ที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการจัดเรียงตัวใหม่และเปลี่ยนเป็น oligomer เมื่อหลายโมนิเมอร์มาเชื่อมต่อกัน จะเกิดการเรียงตัวในรูปแบบ oligomeric ring หรือ arc-shaped prepare complex โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 296 Å

ซึ่งมีโครงสร้าง α -helices 6 เส้น และเปลี่ยนเป็น β -hairpins 2 เส้น เมื่อโมโนเมอร์ของ β -hairpins มีการเชื่อมต่อกันผ่านปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของ β 1-strand และ β 4-strand ของโมเลกุลเดี่ยวสองตัวกลายเป็น โครงสร้าง β -barrel และฝังตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ Domain ที่เชื่อมต่อกันระหว่าง D2 และ D3 ทำหน้าที่เป็น hinge joint ช่วยให้โครงสร้างใน D3 สามารถเคลื่อนเข้าไปใกล้เยื่อหุ้มเซลล์และสร้างรูพรุนในเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีคอเลสเตอรอลจะทำให้เกิดการรั่วไหลของสาร ในเซลล์ (Tenenbaum, et al., 2016) (ภาพที่ 5)



ภาพ 5 การสร้างรูพรุนบนเมมเบรนของโปรตีน Sly จากซ้ายไปขวาโดยโมโนเมอร์จับกันเป็นโอลิโกเมอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการก่อตัวของ oligomeric ring หรือ arc-shaped prepare complex จากนั้นจะยุบตัวลงโดยมี β -hairpins คลื่นออกและสอดเข้าไปใน lipid bilayer และไขมันจะถูกขับออกมา

ที่มา: Leung, et al., 2014

ยีนก่อโรคที่เกี่ยวข้อง (Virulence factors)

1. จีโนมของ *S. suis* มีความยาว 2,014,917 คู่เบส มีปริมาณ CG content เท่ากับ 41.3% และยังไม่พบหน้าที่ของยีนประมาณ 20–30% อย่างไรก็ตามหลายยีนอาจจะมีบทบาทที่สำคัญในการก่อโรคที่รุนแรง (Lun, et al., 2007) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันก่อให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงและการเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิดอัตราการตายสูงขึ้นได้แก่

1.1 Muramidase-released protein และ Extracellular factor

MRP เป็นโปรตีนในผนังเซลล์ของ *S. suis* มีน้ำหนักโมเลกุล 136 kDa จะถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายด้วยไลโซไซม์ (lysozyme) และยังสามารถตรวจจับ human fibrinogen ซึ่งส่งผลให้เกิดการทำลาย p120-catenin ใน cerebral microvascular endothelial cell ของมนุษย์ และเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของ Blood-Brain-Barrier

EF เป็นโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ มีน้ำหนักโมเลกุล 110 kDa โดยทั้ง MRP และ EF มักถูกแยกได้จาก *S. suis* serotype 2 เป็นไปได้ว่าอาจมีความเกี่ยวข้องต่อความรุนแรง

1.2 Fibronectin binding protein (FBPS)

FBPS เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของแบคทีเรีย สามารถจับกับ fibronectin และ fibrinogen ในสารเคลือบเซลล์ (Extracellular matrix: ECM) โครงสร้าง FBPS ประกอบด้วยสองส่วนโดยเป็นโปรตีนทั้งหมด ปลาย N (FBPS-N) และ ปลาย C (FBPS-C) โดยที่ปลาย N จะจับกับพื้นผิวของแบคทีเรีย ในขณะที่ปลาย C จะจับกับเซลล์ของโฮสต์ผ่าน Fibronectin มีความเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับเซลล์โฮสต์

1.3 Sortase (srt)

เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยึดโปรตีนของแบคทีเรียเข้ากับ peptidoglycan ด้วยพันธะโควาเลนต์ เอนไซม์ srt แบ่งออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ A B C D และ E อย่างไรก็ตามค้นพบ srt F ใน *S. suis* serotype 2 สายพันธุ์ 05ZY33 อย่างไรก็ตามการขาดหายไปของยีน srt F ไม่มีผลต่อความรุนแรงในสายพันธุ์

1.4 Subtilisin-like serine protease (SspA)

SspA มีน้ำหนักโมเลกุล 170 kDa มีบริเวณอนุรักษ์ LPXTG motif ที่ปลาย C มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนเอส (protease) ย่อยสลาย fibrinogen และยับยั้งการสังเคราะห์ fibrin ที่มาจาก thrombin โดย SspA สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytokine ได้แก่ IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL8 และ CCL5 ใน monocytes และ macrophages ของมนุษย์ โดยมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองต่อการอักเสบที่นำไปสู่กลุ่มอาการ Streptococcus toxic shock syndrome

1.5 HP0197

เป็นโปรตีนผิวที่พบในเกือบทุก ST ของ *S. suis* serotype 2 สามารถจับกับ glycosaminoglycans (GAGS) บนผิวของโฮสต์ ที่ปลาย N นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ Hep-2 ที่มาจาก HP0197-Heparin อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมโดยช่วยให้ *S. suis* serotype 2 สามารถดึงกลูโคสจากสิ่งแวดล้อมมาใช้ได้

1.6 Two-component system (TCS) and orphan regulation factor

TCS ประกอบด้วย histidine protein kinase ยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ตรวจจับสัญญาณภายนอกและปัจจัยควบคุมการถอดรหัสที่อยู่ในไซโตพลาซึมทำให้แบคทีเรียรับรู้การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอกและปรับการถอดรหัสของยีนเป้าหมายผ่าน TCS ใน *S. suis* serotype 2 มีระบบ TCS หลายชนิด ได้แก่ SalK/SalR, CiaR/CiaH, Ihk/Ihr, Vrir/VriS และ NisK/NisR

1.7 Arginine deiminase system (ADS)

ADS เป็นแหล่งเมทาบอลิซึมในแบคทีเรียซึ่งจะเผาผลาญอาร์จินีนโดยกระบวนการเอนไซม์เพื่อสร้างพลังงานในรูปของ ATP

1.8 Collagen-binding protein (Cbp40)

Cbp40 มีขนาดโมเลกุล 3,000 bp เป็นโปรตีนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่พบใน *S. suis* serotype 2 สายพันธุ์ที่รุนแรง ซึ่งสามารถเกาะติดกับคอลลาเจนได้ ทั้งนี้ *S. suis* serotype 2 ที่มีการขาดหายไปของยีน Cbp40 แสดงความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์และการสร้างไบโอฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

1.9 Bacterial small RNA (sRNA)

เป็นตัวควบคุมความรุนแรงที่สามารถควบคุมการแสดงออกของแบคทีเรียได้โดยตรงหรือโดยอ้อม มีขนาดเล็กกว่า 500 นิวคลีโอไทด์ แบ่งออกได้หลายประเภทได้แก่ intergenic sRNA, Antisense sRNA, protein-binding sRNA และ ribose switch sRNA

1.10 Biofilm

เป็นโครงสร้างลักษณะเยื่อบาง ๆ ประกอบด้วย polysaccharides, fibrin, nucleic acid และ lipids หรือก่อตัวจากองค์ประกอบอื่น ๆ biofilm สามารถยับยั้งหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจะขึ้นอยู่กับกายวิภาคและองค์ประกอบของ biofilm ของ *S. suis* serotype 2 สามารถยับยั้งการถูกกลืนกิน การทำลายโดยยาปฏิชีวนะ และการดักจับของ Neutrophil extracellular traps (NETs) ซึ่งมีส่วนช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดในกระแสเลือดได้

1.11 Capsular polysaccharides (CPS)

บนผิวของแคปซูลมี sialic acid สามารถถูกปรับเปลี่ยนเพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจจับสนภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ โดย CPS ของ *S. suis* serotype 2 ประกอบด้วยน้ำตาล 5 ชนิด ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ sialic acid (N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) เป็น anti-phagocytic factor ซึ่งสามารถกระตุ้น complement alternative pathway โดย sialic acid ส่งเสริมการจับกันของ C3b กับ factor H, FH), ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ C3 convertase (C3bBb), ขัดขวางการทำงานของ phagocytosis ใน *S. suis* serotype 2 สายพันธุ์ 05ZY33 พบยีน NeuB, NeuC, NeuD และ NeuA ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการเมทาบอลิซึมของ sialic acid

2. Complement system

ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์แบ่งออกเป็นสองแบบคือ ภูมิคุ้มกันโดยทั่วไป (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันจำเพาะเจาะจง (Adaptive immunity) ซึ่งแบคทีเรียได้พัฒนากลไกการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของโฮสต์ดังนี้ 1. การย่อย complement ด้วย protease เพื่อย่อยสลายให้เป็นเปปไทด์ที่ไม่สามารถทำงานได้ 2. การดึงดูดหรือเลียนแบบตัวควบคุม complement ตามธรรมชาติของโฮสต์โดยยึดติดกับ complement ที่ละลายได้ของโฮสต์ เช่น FH, CFHL-1 และ C4BP 3. การสร้างปัจจัยยับยั้ง Complement ที่ได้จากเชื้อก่อโรคเอง เช่น *S. aureus* สร้าง helix protein ขึ้นมาเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ C3 convertases ทำให้การทำงานของ Complement ถูกยับยั้ง

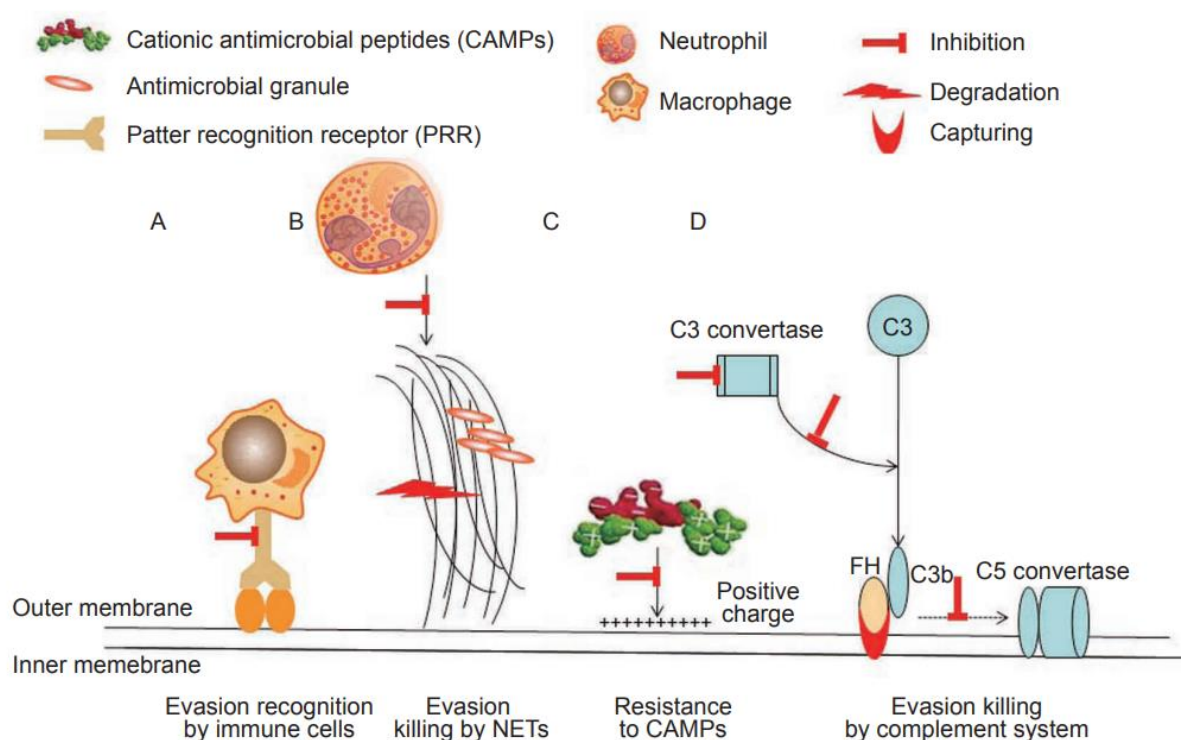
กลไกของผิวเซลล์ของ *S. suis* serotype 2 ที่ช่วยหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน ดังนี้

1. Factor-H-binding protein (Fhb) ของเชื้อจับกับ FH เพื่อป้องกันการสะสมของ C3b บนผิวของแบคทีเรียส่งผลให้ alternative pathway ถูกบล็อกการทำงาน
2. แบคทีเรียหลั่ง IgM protease ตัดสายโซ่ที่บริเวณ N-terminus ของ C3b domain
3. NETs ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก Neutrophil ซึ่งเป็นกลไกที่ดักจับเชื้อก่อโรคได้หลายชนิดโดยมีปัจจัยหลายอย่างที่สามารถกระตุ้นการปลดปล่อย NETs คือ peptidoglycan, LPS, phorbol myristate acetate (PMA), interleukin 8 และ H_2O_2 ซึ่งแคปซูลของ *S. suis* serotype 2 มีองค์ประกอบเป็น peptidoglycan ซึ่งทำให้ neutrophil สามารถตรวจจับได้อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียได้มีการหลั่ง nuclease ที่ชื่อ EndA เป็นเอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลาย NETs

4. D-Aminoacylation of lipoteichoic acids (LAT) ช่วยเพิ่มประจุบวกบนผิวของแบคทีเรียในการต้านทาน Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) ซึ่งเป็นกลไกทำลาย

แบคทีเรียด้วยประจุลบ โดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติประจุบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียด้วยการเติม D-alanine บน LAT ทำให้ต้านทาน CAMPs ได้

5. N-Deacetylation of peptidoglycan: peptidoglycan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกเชื้อต่อการรับรู้ภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติโดยโฮสต์ โดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์สามารถตรวจจับ mucopeptides และชิ้นส่วนของ peptidoglycan ของแบคทีเรียได้ระหว่างการปลดปล่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากกิจกรรมไฮโดรไลติกของเอนไซม์ไลโซไซม์ผ่านการรับรู้ของโปรตีน Nod1 และ Nod2 อย่างไรก็ตาม *S. pneumoniae* และ *Listeria monocytogenes* สามารถทำให้ N-deacetylation กับหมู่ N-acetylglucosamine เปลี่ยนเป็น glucosamine หรือ muramic acid ได้โดยการอาศัยโปรตีน pgdA กลไกการดัดแปลงเหล่านี้ของ peptidoglycan ช่วยให้แบคทีเรียสามารถหลีกเลี่ยงการตรวจจับของโปรตีน Nod1 และ Nod2 ได้ บ่งชี้ได้ว่า pgdA มีบทบาทต่อการเพิ่ม N-deacetylation เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อไลโซไซม์ของ (Fan, 2017)



ภาพ 6 กลไกการหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์

โดยที่ A: การปรับเปลี่ยนโครงสร้างพื้นผิวของแบคทีเรีย ได้แก่ Capsular polysaccharides, lipoteichoic acid และ peptidoglycan เพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจจับและการจับกินของ phagocytosis, B: *S. suis* serotype 2 หลัง nuclease ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อย DNA ของ NETs โดยมีการป้องกันเซลล์ให้อยู่

รอดด้วย capsule และผลิต D-alanylated บน LTA และการมี biofilm หรือการสร้างโปรตีนบางอย่าง ขึ้นมาเพื่อยับยั้ง NETs ที่จะถูกปลดปล่อยออกมาจาก neutrophils, C: LTA-D-alanylation เพิ่มประจุบวกบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อต้านทานต่อประจุลบที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก CAMPs, D: factor H-binding protein (Fhb) และ surface protein (Fhbp) จับกับ factor H เพื่อหลีกเลี่ยงการสะสมของ C3b บนผิวของแบคทีเรียทำให้บล็อกการทำงานของ Complement system

ที่มา: Fan, 2017

แนวทางการรักษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

S. suis เป็น microflora ในช่องปากของสุกร มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคทำให้การแยกเชื้อเป็นไปได้ยากเนื่องจากมีการปะปนของ streptococci สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ในช่องปากที่มีลักษณะทางฟิโนไทป์คล้ายคลึงกับ *S. suis* ที่ก่อโรค โดยการระบุสายพันธุ์ทำได้ ดังนี้

1. การระบุเชื้อเบื้องต้นโดยวิธี biochemical และ serological ได้แก่ Gram stain, Voges-Proskauer, salicin, trehalose และ 6.5% NaCl ลักษณะทางชีวเคมีมีความหลากหลายทำให้การระบุสายพันธุ์เป็นเรื่องยาก และมักต้องใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่างร่วมกัน จากนั้นจึงยืนยันด้วยการตรวจ serotype เพื่อความแม่นยำซึ่งมีหลายเทคนิค ได้แก่ capsular reaction, capillary precipitation และ co-agglutination test

2. การตรวจหาและระบุสายพันธุ์ *S. suis* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เช่น การตรวจวิเคราะห์ PCR ที่มุ่งเป้าหมายไปยังยีน housekeeping ที่เฉพาะเจาะจงซึ่งสร้างเอนไซม์ glutamate dehydrogenase (gdh), โพรบ 16s ribosomal RNA (rRNA) และ multiplex PCR assay เป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามการใช้การทดสอบนี้อาจมีความเสี่ยงในการระบุ *S. gallolyticus* ผิดพลาดว่าเป็น *S. suis* และยังมี immunocapture method อื่นๆ ได้แก่ fluorescent antibody techniques, whole-cell antigen-based indirect ELISA และ purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA

3. การตรวจสอบด้วย Molecular methods ได้แก่ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), genome fingerprinting, pulsed-field gel electrophoresis และ Multilocus sequence typing ซึ่งเทคนิคนี้สามารถระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ในการก่อโรค

S. suis เป็นพาหะสู่คนโดยเฉพาะผู้ประกอบอาชีพเกษตรกร สัตวแพทย์ พนักงานโรงฆ่าสัตว์ และพนักงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีความใกล้ชิดกับสุกรซึ่งบางครั้งสามารถพบได้ในหมู่น้ำ ม้า สุนัข และแมว โดยมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้หลายปัจจัยซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากสภาวะการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจากรายงานความทนทานของเชื้อ *S. suis* serotype 2 ต่อสภาวะแวดล้อมพบว่าที่สามารถอยู่ในอากาศได้ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C เชื้อสามารถอยู่ได้ 24 ชั่วโมง และในอุจจาระ 8 วัน แต่อย่างไรก็ตาม *S. suis* serotype 2 สามารถกำจัดได้ด้วยน้ำยาฟอกขาวความเข้มข้น 5% โดยมีอัตราเจือจาง 1:799 ทั้งนี้การประเมินความเสี่ยงเบื้องต้นของการติดเชื้อมักอ้างอิงจากอาการทางคลินิกและรอยโรคที่สามารถมองได้ด้วยตาเปล่า (Goyette-Desjardins, et al., 2014 และ Lun, et al., 2007) และการควบคุมโรคในสุกรจะรักษาตามอาการรวมกับการใช้ยาปฏิชีวนะ (Gottschalk, et al., 1991) โดย *S. suis* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactam (Gottschalk, 2024) และกลุ่ม Cephalosporin ยกตัวอย่างเช่น Penicillin, Cephalosporin, Ampicillin และ Amoxicillin อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดสอบยาปฏิชีวนะและพบว่า *S. suis* ตี้อยู่ต่อยา Penicillin และยาปฏิชีวนะตัวอื่นมากขึ้น (Lun, et al., 2007) สอดคล้องกับการศึกษาความชุกและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. suis* ข้อมูลจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนครราชสีมา ในช่วงปี พ.ศ. 2555–2559 โดยทำการตัดแยกเชื้อจากตัวอย่างเลือด น้ำไขสันหลัง และสารคัดหลั่งอื่น ๆ มาทำการทดสอบความไวของเชื้อโดยวิธี disc diffusion test ด้วยยาปฏิชีวนะ Penicillin พบว่าความไวต่อยา penicillin ลดลงจากร้อยละ 95 เป็นร้อยละ 88 (Singpoltan, 2019) ทั้งนี้สถานการณ์ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันสำหรับมนุษย์ สิ่งที่ได้คือการให้ความรู้แก่ประชาชนในกลุ่มผู้เลี้ยงสุกรและวิธีการจัดการกับสุกร เช่น การสวมถุงมือ การล้างมือ และการปรุงสุก (Lun, et al., 2007)

เทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology)

เทคโนโลยีชีวภาพมีจุดเริ่มต้นในทศวรรษที่ 1900 ด้วยเทคโนโลยีการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ เช่น อะซิโตน บิวทานอล และกรดซิตริก ซึ่งต่อมามีการนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น ก้าวที่สำคัญในการประวัตินวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพคือปี 1971 ด้วยการค้นพบ recombinant DNA (ดีเอ็นเอสายผสม) โดย Berg, Cohen และ Boyer ในแคลิฟอร์เนีย โดยเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์ถูกพัฒนาสู่โปรตีนสังเคราะห์หรือ recombinant protein (โปรตีนสายผสม) ภายในปี ค.ศ. 2002 มีวัคซีนและผลิตภัณฑ์ยาที่ได้รับการอนุมัติมากกว่า 155 รายการโดยองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) ประกอบด้วยโปรตีนที่ได้รับการรับรองมากกว่า 200 รายการ

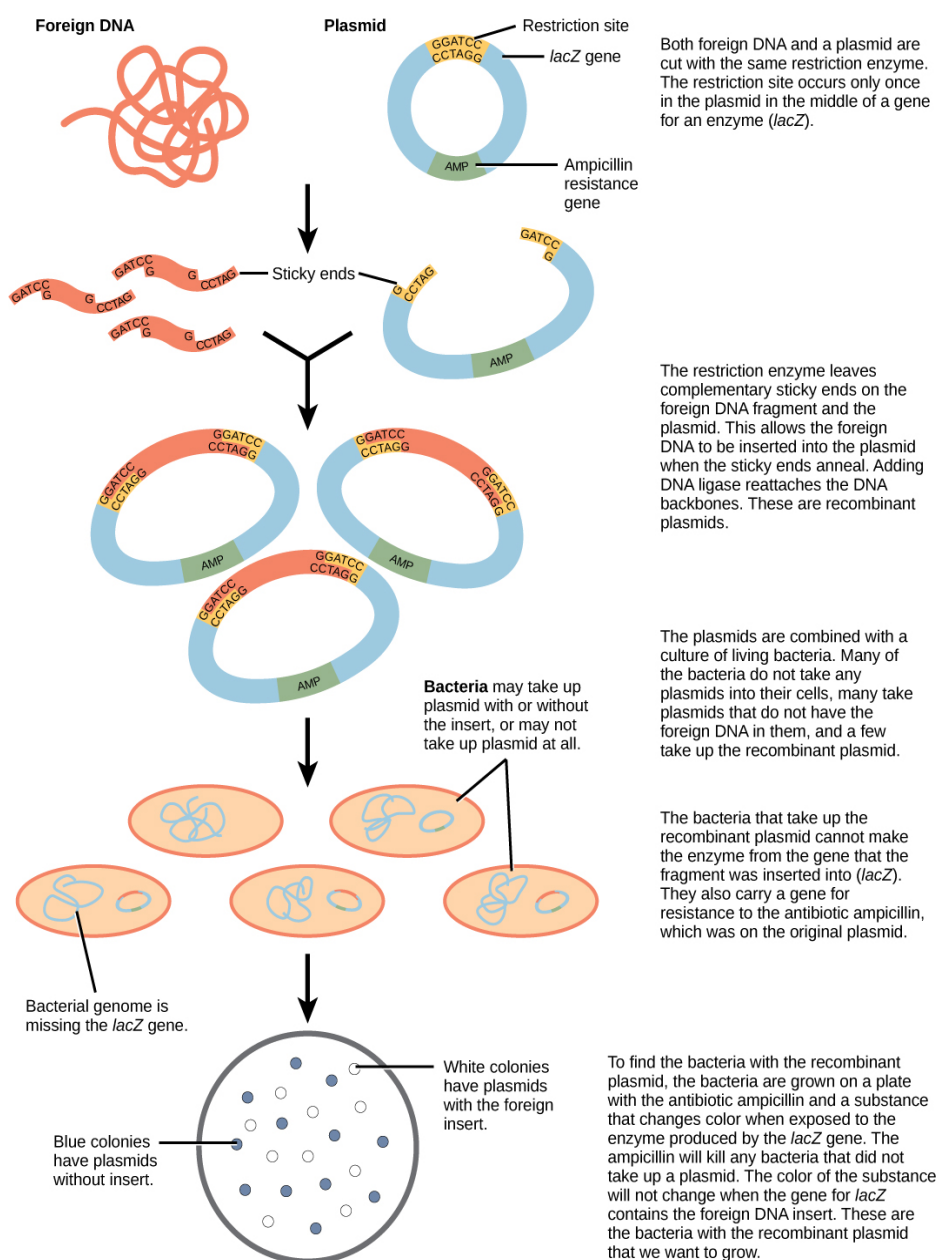
กรดอะมิโน เป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีนโดยประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโนหลายพันโมเลกุลมีลักษณะโครงสร้างสามมิติที่ซับซ้อนซึ่งมีความสำคัญต่อการกำหนดหน้าที่ และยังเป็นหน่วยย่อยของโครงสร้างพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดซึ่งจะถูกสร้างโดยไรโบโซมผ่านกระบวนการ Translation โดยมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพต่าง ๆ

โปรตีนเป็นสารชีวภาพโมเลกุลขนาดใหญ่ที่จำเป็นต่อกระบวนการทางชีววิทยาต่าง ๆ เช่น เพื่อใช้ในการดำรงชีวิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในรูปแบบเอนไซม์ โปรตีนส่งสัญญาณ และกลไกป้องกันภัยเป็นต้น การนำเทคโนโลยีจุลินทรีย์มาใช้ในประจำวันได้แก่ เอนไซม์ อาหารเสริม วิตามินแอนด์บอดี ยาปฏิชีวนะ และวัคซีน เป็นต้น โดยทั่วไปโปรตีนเหล่านี้ถูกผลิตด้วยวิธีดั้งเดิมและแบบโปรตีนสายผสม อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ได้โดยตรงจากแหล่งจุลินทรีย์ธรรมชาติ ในขณะที่โปรตีนที่ผลิตในระบบสายผสม (recombinant) สามารถให้ผลผลิตสูงและผลิตได้อย่างสม่ำเสมอตามความต้องการ โดยเทคโนโลยี recombinant DNA มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการแก้ไขช่วยปัญหาการขาดแคลนโปรตีนธรรมชาติที่มีคุณค่า

Recombinant DNA ประกอบขึ้นด้วยสองส่วนคือ 1. plasmid ซึ่งสามารถพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็กซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกหลานผ่านการแบ่งเซลล์แบบ Binary fission และ Conjugation เป็นต้น 2. DNA target ซึ่งมีหลายประเภทได้แก่ แอนติเจน แอนติบอดี ฮอโมน และเอนไซม์ (Biswas, et al., 2016)

Cloning คือ กระบวนการทำสำเนาขึ้นจำนวนมากโดยการนำชิ้นเป้าหมายตัดต่อเข้าสู่ vector ด้วย restriction enzyme ซึ่งบริเวณที่ถูกตัดของ plasmid จะสามารถประกบกับปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และถูกเชื่อมต่อกันด้วย DNA ligase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะเชื่อมต่อกับปลายทั้งสองข้างของ vector โดยเรียก vector ที่มีชิ้น DNA ว่า recombinant vector ซึ่งบางกรณีปลายทั้งสองข้างของ vector จะถูกดึงกลับเข้าสู่โครงสร้างเดิมเรียกว่า circularized vector หลังจากได้ recombinant vector ทำการถ่ายฝาก (transformation) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และเข้าสู่ขั้นตอนการคัดเลือกขึ้นที่ต้องการ (Brooker, 2018) (ดังภาพที่ 7)

Selectable marker genes เป็นส่วนสำคัญของ vector ใช้สำหรับการคัดเลือกและระบุเซลล์ที่ผ่านกระบวนการถ่ายฝาก (transformed cells) เซลล์ที่มีชิ้นเป้าหมายจะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารคัดเลือก โดยยีนมาร์กเกอร์ที่ได้รับความนิยม ได้แก่ Antibiotics resistance gene (ตารางที่ 1) และ Color substance developing genes (Biswas, et al., 2016)



ภาพ 7 แสดงภาพการ cloning ในแบคทีเรีย

ที่มา: Molner, C., and Gari, J. (Eds). (2015). Concepts of Biology – 1st Canadian Edition.
Ontario OER Collection. BCcampus. pp: 335–362. <https://opentextbc.ca/biology/>

ตาราง 1 แสดงยาปฏิชีวนะและกลไกการออกฤทธิ์

(Biswas, et al., 2016)

Antibiotic	Mode of Action
Ampicillin	ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการแข่งขันของเอนไซม์ทรานส์เพปติเดส (transpeptidase)
Tetracycline	จับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมและยับยั้งการแปลรหัสโปรตีน
Chloramphenicol	จับกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซมและยับยั้งการแปลรหัสโปรตีน
Kanamycin	จับกับองค์ประกอบของไรโบโซมและยับยั้งการแปลรหัสโปรตีน
Bleomycin	จับกับ DNA และทำให้เกิดการแตกหักของสาย DNA
Hygromycin	ยับยั้งการแปลรหัสโปรตีนโดยรบกวนการเคลื่อนที่ของไรโบโซม และออกฤทธิ์ทั้งในโพรคาริโอตและยูคาริโอต

การผลิตโปรตีนสายผสม จะต้องใช้ระบบการแสดงออกที่เหมาะสม ระบบการแสดงออกสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทหลักคือ 1. Prokaryotic systems ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นโฮสต์ที่นิยมใช้เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและสามารถแสดงออก heterologous proteins ในระดับสูงได้ 2. Eukaryotic systems ในระบบการแสดงออกนี้ผลิตภัณฑ์โปรตีนส่วนใหญ่ที่ได้มักจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มไม่ละลายน้ำที่เรียกว่า inclusion bodies (IBs) และไม่สามารถทำการปรับเปลี่ยนหลังการแปลรหัส (post-translational modifications) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงาน ความเสถียร หรือการตอบสนองต่อแอนติบอดีของโปรตีน โดยข้อดีของระบบการแสดงออกนี้คือ มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สูงมากเพื่อรองรับความต้องการสูงของอุตสาหกรรม ตัวอย่างระบบการแสดงออกทั้งสองระบบ (ดังตารางที่ 2 และ 3) (Biswas, et al., 2016)

ตาราง 2 ระบบแสดงออกในโพรคาริโอต

(Biswas, et al., 2016)

System	Advantages	Drawback	Stage of Development
<i>Escherichia coli</i>	ผลผลิตสูง, มีตัวเลือกขององค์ประกอบทางพันธุกรรมมาก	ไม่มีการปรับเปลี่ยนหลังการแปลรหัส, การหลังโปรตีนทำได้ยาก	การผลิต
<i>Bacillus</i>	การหลังโปรตีน, โปรตีนเอสต่ำ, แสดงออกบนพื้นผิว	ไม่มีการปรับเปลี่ยนหลังการแปลรหัส	การผลิต / การพัฒนา
<i>Caulobacter crescentus</i>	การทำให้บริสุทธิ์ง่าย, การหลังโปรตีน	ไม่มีการปรับเปลี่ยนหลังการแปลรหัส	การวิจัย / การพัฒนา
<i>Lactobacillus zeae</i>	ปรับตัวให้เหมาะกับผลิตภัณฑ์ที่ไวต่ออุณหภูมิ	ไม่มีการปรับเปลี่ยนหลังการแปลรหัส	การพัฒนา
Exotic hosts (cold bacteria)	–	ถูกจำกัดการใช้งานในบางแอปพลิเคชัน	การวิจัย

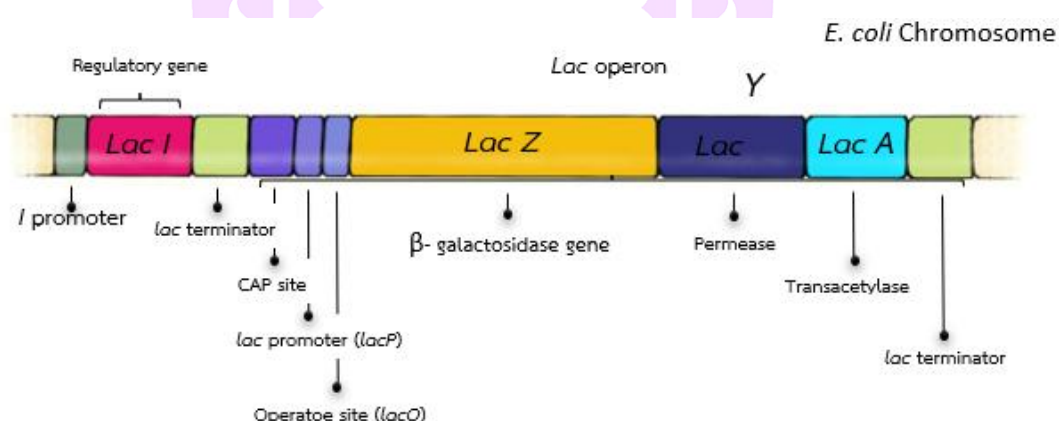
ตาราง 3 ระบบแสดงออกในยูคาริโอต

(Biswas, et al., 2016)

System	Advantages	Drawback	Stage of Development
Mammalian cells	การหลังที่เหมาะสมสำหรับโมเลกุลที่ซับซ้อน	ต้องการสารเติมแต่ง, ผลผลิตต่ำ	การผลิต
Insect cells	ผลผลิตสูง, ใช้สื่อเลี้ยงเซลล์ง่าย, ปลอดภัยจากไวรัส	ไกลโคซิเลชัน	การผลิต/ การพัฒนา
Vegetal	การหลังไบโอแมส, ปลอดภัยจากไวรัส	ไกลโคซิเลชัน	การผลิต/ การพัฒนา
Yeast	การหลังไบโอแมส	ไกลโคซิเลชัน	การผลิต
Trypanosome	ความสามารถในการเติบโตในสภาวะสุดขีด/วัสดุเหลือใช้	พันธุกรรมยังต้องศึกษาเพิ่มเติม	การวิจัย/ การพัฒนา
Transgenic animals	การไกลโคซิเลชันที่คล้ายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เหมาะสำหรับโมเลกุลซับซ้อน	พันธุกรรมยังต้องศึกษาเพิ่มเติม, ใช้เวลานาน, จำกัดเฉพาะผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง	การวิจัย/ การพัฒนา

ภายในโครโมโซมของแบคทีเรียจะมียีนบางส่วนที่ควบคุมการแสดงออกอย่างต่อเนื่อง โดยยีนเหล่านี้จะสามารถเข้ารหัสเพื่อผลิตโปรตีนที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย เรียกว่า ยีนเหล่านี้ ว่ายีนที่ไม่ได้รับการควบคุมหรือยีนส่วนประกอบ ซึ่งยีนส่วนใหญ่จะเป็นยีนที่ได้รับการควบคุมเพื่อผลิตโปรตีนเฉพาะในปริมาณที่เหมาะสมและจำเป็นเท่านั้น เมื่อไม่มีความจำเป็น เซลล์จะหลีกเลี่ยงการเข้ารหัสโปรตีนเพื่อลดการสูญเสียพลังงาน โดยกลุ่มยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน เรียกว่า Operon มีองค์ประกอบหลักดังนี้

1. Regulator promoter (lacI) บริเวณควบคุมดำเนินการสังเคราะห์ โดยสร้าง repressor protein ไป จับกับ lacO เพื่อยับยั้งไม่ให้เอนไซม์ RNA Polymerase สังเคราะห์ RNA
2. Promoter promoter (lacP) บริเวณส่งเสริมที่จับกับเอนไซม์ RNA Polymerase และเคลื่อนที่ไปยัง Structural promoter หรือ lacZ lacY และ lacA
3. Operator promoter (lacO) เป็นบริเวณที่จับกับ repressor protein
4. Structural promoter เป็นบริเวณหลักที่มีข้อมูลทางพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน โดยตรงซึ่งการแสดงออกของยีนโครงสร้างจะถูกควบคุมจากยีนที่เกี่ยวข้องข้างต้น (ดังภาพที่ 8)



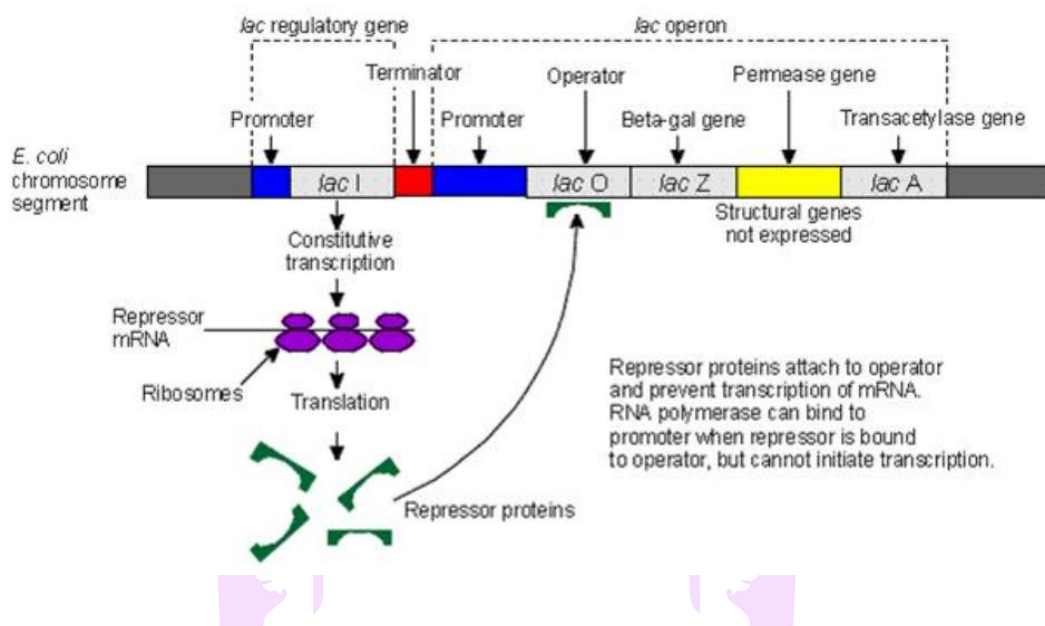
ภาพ 8 Operon และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมบนโครโมโซมของ *E. coli*

ที่มา: Modified from Brooker, R. J. (2018)

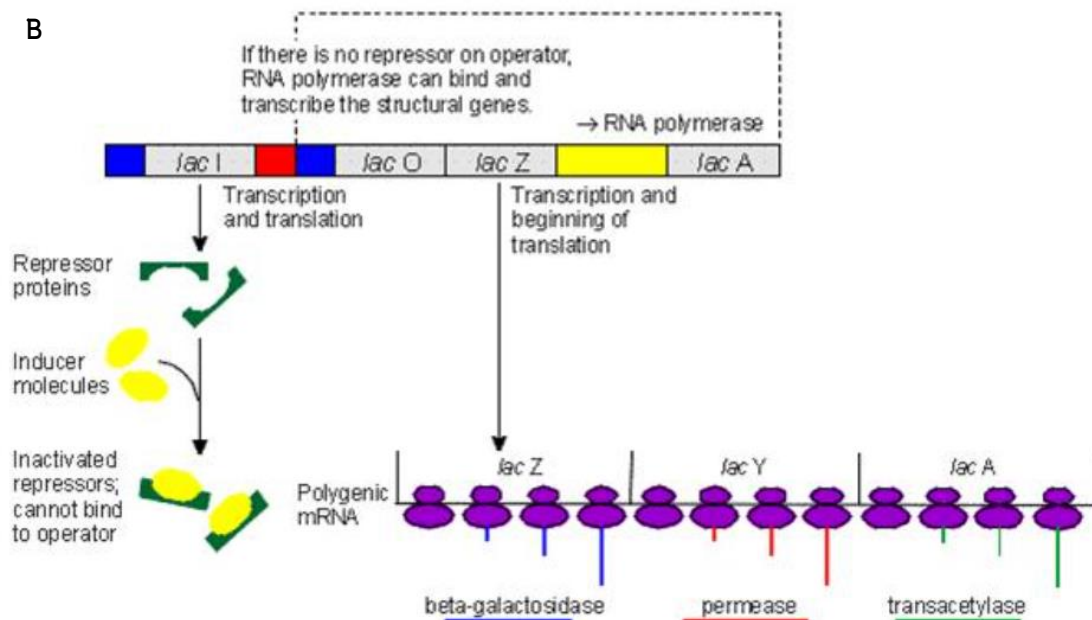
Gene expression in bacteria: การควบคุมการแสดงออกของ operon เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อ lacI จะสังเคราะห์ repressor protein ไปจับกับตำแหน่ง operator เพื่อไม่ให้ RNA polymerase (RNAP) สามารถสังเคราะห์ RNA ที่ตำแหน่งยีนโครงสร้างได้ (ภาพที่ 9A) และการควบคุมการแสดงออกของ operon เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อ operon จะสังเคราะห์ กลุ่มเอนไซม์ β -galactosidase เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสให้อยู่

ในรูป allolactose ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัว inducer จับกับ repressor protein ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโปรตีนทำให้ไม่สามารถจับกับ operator ได้ RNA polymerase จึงสามารถสังเคราะห์ RNA ที่ตำแหน่งยีนโครงสร้างได้ (ภาพที่ 9B) (Brooker, 2018)

A



B



ภาพ 9 การผลิตโปรตีนในระบบ operon, A: การทำงานของ operon ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาลแลคโตส และ B: การทำงานของ operon ในสถานะที่มีน้ำตาลแลคโตส

การผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำ (Soluble expression protein)

การผลิตโปรตีนที่มีความเป็นพิษการแสดงออกแบบถาวรอาจทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ จนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบการแสดงออกหลายระบบซึ่งสามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีน heterologous ได้ในระดับที่ต่างกัน ระบบเหล่านี้แตกต่างกันไปในหลายด้าน เช่น ความชอบของโฮสต์, plasmid backbone, transcription terminators, ระบบการเหนี่ยวนำ และโปรโมเตอร์ (Chaudhary & Lee., 2015)

E. coli เป็นแบคทีเรียที่ได้รับความนิยมมากที่สุดเนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีความหนาแน่นของเซลล์สูงและแหล่งคาร์บอนราคาถูก (Ho, et al., 2021) นอกจากนี้ยังสามารถเลือก pET expression ได้มากกว่า 100 ระบบ ซึ่งมีงานวิจัยมากกว่า 200,000 ฉบับที่มีการใช้ pET vector อีกทั้งมีรายงานโครงสร้างโปรตีนในฐานข้อมูล Protein Data Bank มากกว่า 128,000 โครงสร้าง และประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่ผลิตทั่วโลกเพื่อการวิจัยและการใช้งานเชิงพาณิชย์ถูกผลิตขึ้นในระบบการแสดงออกนี้ ตัวอย่างงานวิจัย ดังนี้

Mohamed, et al. (2019) ศึกษาการผลิตกรดไขมันิกโดยหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่เหมาะสมในระบบการแสดงออกของ *E. coli* BL21 (DE3) พบการผลิตกรดไขมันิกได้สูงสุด 8.69 g/L ในอาหารสูตร SOB ที่มีการเติมโซลิส 10 g/L ที่มีทริปโตน 20 g/L และ ยีสต์ 5 g/L

Carmignotto and Azzoni. (2019) ศึกษาการแสดงออกของ CRISPR-associated protein 9 ในระบบการแสดงออก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และ Rosetta (DE3) เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังชีวปฏิกรณ์ โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน พบว่าในระบบการแสดงออกของ *E. coli* BL21 (DE3) สามารถผลิตโปรตีน Cas9 ได้ดีกว่า โดยมีความเข้มข้นประมาณ 420.1 mg/L

Escherichia coli BL21 (DE3) เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการออกแบบมาโดยเฉพาะเพื่อใช้ในการโปรตีนสายผสม และอนุพันธ์ต่าง ๆ (Heyde & Nørholm, 2021) โดยพื้นฐานของสายพันธุ์นี้มาจาก *E. coli* B ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่สำคัญในยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีเอส ได้แก่ Lon protease (อยู่ในไซโตพลาซึม) และ OmpT protease (อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นนอก) การกลายพันธุ์ดังกล่าวช่วยลดการย่อยสลายของโปรตีนที่ผลิตออกมาในเซลล์ ทำให้เหมาะสำหรับการผลิตโปรตีนในปริมาณสูง ระบบการแสดงออกของยีนใน BL21(DE3) ถูกควบคุมโดย RNA polymerase ของ *E. coli* เช่น lac, tac, trc, ParaBAD, PrhaBAD และ T5 promoters อย่างไรก็ตาม ความโดดเด่นของสายพันธุ์นี้คือ λ DE3 lysogen ที่แทรกอยู่ในจีโนม ซึ่งประกอบด้วย ยีน T7 RNA polymerase ที่ถูกควบคุมโดย LacUV5 promoter (PlacUV5) ทำให้สามารถใช้ร่วมกับ vector กลุ่ม pET

vectors ซึ่งมี T7 promoter ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน อย่างไรก็ตามหนึ่งในข้อจำกัดของระบบนี้คือการเกิด "leaky expression" หรือการแสดงออกของโปรตีนในระดับต่ำ แม้ในกรณีที่ยังไม่มีสารกระตุ้น (IPTG) (Chaudhary & Lee, 2015) ซึ่งอาจสร้างปัญหาได้โดยเฉพาะในกรณีของยีนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ *E. coli* เนื่องจากการแสดงออกก่อนเวลาอันควรอาจรบกวนกระบวนการเจริญเติบโตหรือการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ สำหรับยีนที่มีพิษปานกลางผลกระทบอาจเกิดขึ้นภายหลังจากการเริ่มการกระตุ้น (induction) เมื่อเกิดการสะสมของโปรตีนมากเกินไป ในขณะที่ยีนที่มีพิษรุนแรงอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ทันทีตั้งแต่เริ่มการเพาะเลี้ยง (Saïda, 2007) เพื่อลดปัญหาดังกล่าว การเติมกลูโคส 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยยับยั้งการแสดงออกพื้นฐานของ T7 RNA polymerase ที่ควบคุมโดย LacUV5 promoter ผ่านกลไก catabolite repression (Gheibi Hayat, et al., 2018) ทำให้สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนได้ดีขึ้น และลดความเสี่ยงจากความเป็นพิษของยีนเป้าหมาย

T7 promoter เป็นโปรโมเตอร์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการผลิตโปรตีนสายผสม โดยการแสดงออกของยีนจะถูกควบคุมโดย T7 RNA polymerase ซึ่งถูกเข้ารหัสในโครโมโซมและอยู่ภายใต้การควบคุมของ lacUV5 promoter ที่เป็น strong variant ของ wild-type lac promoter การเติม IPTG จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เข้ารหัส T7 RNA polymerase อย่างไรก็ตาม ยิ่งระดับ mRNA สูงเท่าใด ยิ่งสามารถผลิตโปรตีนสายผสมได้มากขึ้น เนื่องจากมีโปรโมเตอร์ที่แข็งแรง ซึ่งอาจนำไปสู่ปัญหาการแสดงออกที่มากเกินไป (overexpression) ส่งผลให้เกิดการอิมพัลของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ Sec-translocon ซึ่งมีผลกระทบต่อการสร้างชีวมวลและการผลิตโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ในรูปโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion bodies, IBs) (Zhang, et al., 2015) อย่างไรก็ตาม การลดการก่อตัวของ IBs ในระบบแบคทีเรียสามารถทำได้โดยการลดอุณหภูมิในการเจริญเติบโต ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มอัตราการผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (Schein, 1989).

Synonymous codons คือ การใช้งานโคดอนที่มีความหมายเดียวกัน (Hannig & Makrides., 1998) โดยกรดอะมิโนส่วนใหญ่สามารถเข้ารหัสได้มากกว่าหนึ่งตัวใน codon ตำแหน่งที่ 3 และบางกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 2 โดย codon มีความสำคัญต่อการตรวจจับรหัสในจีโนมและถ่ายทอดยีนต้นแบบออกมา ทั้งนี้เมื่อมีการนำยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านจะมีผลต่อการแสดงออกต่อการผลิตโปรตีนซึ่งมีความเหมาะสมต่อแบคทีเรีย การเลือก codon usage จึงมีบทบาทสำคัญต่อการตรวจจับรหัสในจีโนมของโฮสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดองค์ประกอบยีนอย่างเหมาะสม ซึ่งการใช้ codon ที่ถูกพัฒนาให้เข้ากับจีโนมของโฮสต์ เรียกว่า

“amelioration” (Ermolaeva, 2001) จาก กรณียของยีน human thymidylate synthase (TS) การแปลงเบส purine ในโคดอนที่ 3, 4 และ 5 ใน cDNA ของ TS เป็นไครซีน โดยไม่เปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์โปรตีน ช่วยให้การแสดงออกของยีน TS สูงถึง 25–30% ของโปรตีนทั้งหมดใน *E. coli* (Hannig & Makrides., 1998) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lawrence, et al., (1998) ทำการวิเคราะห์จีโนมของ *E. coli* strain MG1655 พบว่ามี 755 ยีน ใน 4,288 ยีน ซึ่งสามารถเข้ารหัสในจีโนมได้อย่างน้อย 234 รูปแบบ กล่าวคือการเลือกใช้ codon usage ที่เหมาะสมมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน

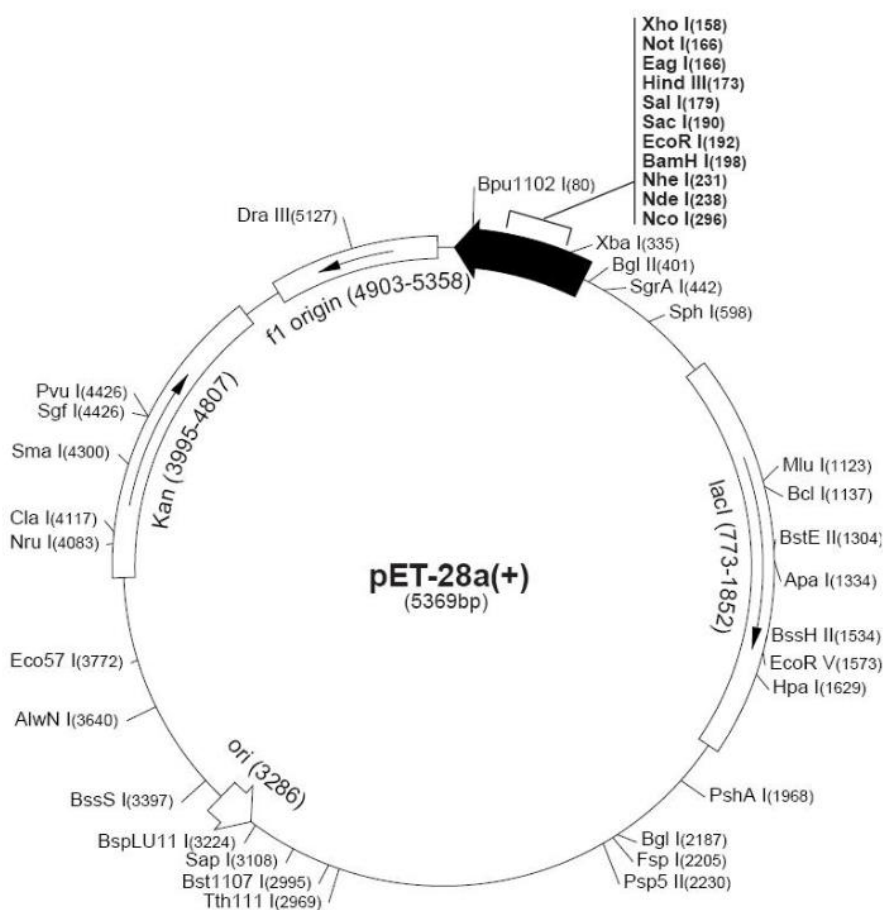
พลาสมิด pET28a เป็น vector ที่นิยมใช้ในงานวิจัยเป็นอย่างมากประกอบไปด้วย 1. T7 promoter ซึ่งเป็น strong promotor ที่สามารถถอดรหัสได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถกระตุ้นโปรตีนออกมาได้ในปริมาณที่สูง 2. ยีนควบคุมการสังเคราะห์ (lac operator sequence) 3. Poly-histidine purification tag (His6) เป็นกรดอะมิโนที่ติดอยู่ที่ปลาย N หรือ C ของโปรตีนสายผสม และมีส่วนช่วยในการจับกับไอออนโลหะซึ่งช่วยให้การตรวจสอบโปรตีน และทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์สะดวกมากขึ้น และ 4. Thrombin protease recognition site (TPS) โดยมี selectable marker คือ Kanamycin ทำให้ง่ายต่อการออกแบบการทดลองและการทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 10) (Shilling, et al., 2020, Zhang, et al., 2015 และ Parisien, et al., 2012)

สัญญาณเปปไทด์ (signal peptide) มีหน้าที่ในการถ่ายโอนและการหลั่งโปรตีนสายผสม ออกจากเซลล์ ในระบบ *E. coli* สัญญาณเปปไทด์ที่อยู่ปลาย N-terminal ส่วนใหญ่จะช่วยให้การถ่ายโอนโปรตีนผ่าน cytoplasmic membrane โดยผ่านทางทางเดินต่าง ๆ เช่น Sec-dependent pathway, signal recognition particle (SRP) pathway หรือ twin-arginine translocation (TAT) pathway หลังจากนั้น สัญญาณเปปไทด์จะถูกตัดโดย signal peptidase ใน periplasmic space ซึ่งมีสัญญาณเปปไทด์หลายชนิดที่มักใช้ในการผลิตโปรตีนสายผสมที่ผลิตใน *E. coli* เช่น pelB, ompA, phoA, malE, lamB และ ompC

Pectate lyase B (pelB) จาก *Erwinia carotovora* (Chung, et al. 1998) มีกรดอะมิโน 22 ตัวที่ปลาย N-terminal ของโปรตีนถูกใช้ในระบบการแสดงออกใน pET vector (Shi, et al., 2021) PelB ถูกนำมาใช้ในระบบโปรตีนสายผสมใน *E. coli* ช่วยให้ผลิตโปรตีนได้ดีในกรณีที่โปรตีนมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ช่วยนำโปรตีนเข้าสู่ periplasmic space ทำให้โปรตีนพับตัวได้ดีขึ้น เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีน และง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้สัญญาณเปปไทด์มีดังนี้

Kasli, et al., (2019) ศึกษาการผลิตโปรตีน scFv antibody (13R4) ในระบบการแสดงออกของ *E. coli* โดยเปรียบเทียบ signal peptides สองชนิด ได้แก่ PelB และ DsbA และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนพบว่า สัญญาณ PelB ทำให้โปรตีน scFv มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี และช่วยลดความเครียดที่เกิดจากการผลิตโปรตีนในเซลล์ *E. coli* ได้ดีกว่า DsbA

Sockolosky and Szoka. (2013) ศึกษาการผลิตโปรตีน hGH (human growth hormone) ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)-RIPL โดยทำการติด signal peptide ได้แก่ PelB และ OmpA เพื่อนำโปรตีนไปยัง periplasmic space พบว่า PelB signal peptide สามารถผลิตโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี และง่ายต่อการทำบริสุทธิ์



ภาพ 10 แผนภาพ pET28a vector

ที่มา: Retrieved from [https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:pET-28a-c\(%2B\).JPG](https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:pET-28a-c(%2B).JPG)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว

- 1.1 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.2 ขวดเก็บสารเคมี (Duran)
- 1.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
- 1.4 จานอาหารเพาะเชื้อ (Petri Dish)
- 1.5 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- 1.6 แท่งแก้วคนสาร (Stirrer Rod)
- 1.7 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 1.8 หลอดทดลอง (Test tube)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.1 กรรไกร (Scissors)
- 2.2 คอลัมน์กรองขนาดอนุภาค (Concentrate column)
- 2.3 คิวเวทท์ (cuvette)
- 2.4 เครื่องกวนสาร (Magnetic Stirrer)
- 2.5 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker)
- 2.6 เครื่องเขย่าสารละลายแบบโยก (Rocker shaker)
- 2.7 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
- 2.8 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Weighing scale)
- 2.9 เครื่องปล่อยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultra-sonicate Homogenizer)
- 2.10 เครื่องปั่นตกตะกอน (Spin Downs)
- 2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 2.12 เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer)

- 2.13 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction Machine)
- 2.14 เครื่องย้ายโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแบบกึ่งแห้ง (Semi Dry Blotting)
- 2.15 เครื่องแยกไฟฟ้าโดยใช้เจล (Gel Electrophoresis)
- 2.16 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 2.17 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop Spectrophotometer)
- 2.18 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 2.19 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตสำหรับส่องเจล (UV-Transilluminator)
- 2.20 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 2.21 ชุดกรองโปรตีนบริสุทธิ์ (HisTrap™ FF column)
- 2.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- 2.23 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack Stainless)
- 2.24 ตัวกรองสารละลาย (Syringe Filter)
- 2.25 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 2.26 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 2.27 ตู้เย็น (Fridge)
- 2.28 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 2.29 ปากคีบ (Forcep)
- 2.30 พลาสติกแรป (Plastic wrap)
- 2.31 พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 2.32 ฟิล์มเอกซเรย์ (X-ray film)
- 2.33 ทรานเฟอร์เมมเบรน (Immobilon®-E PVDF Transfer Membrane)
- 2.34 ไมโครเวฟ (Microwave)
- 2.35 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 2.36 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
- 2.37 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.1 λ DNA-HindIII DNA marker
- 3.2 100 bp ladder plus DNA marker

- 3.3 10 mM dNTP mix
- 3.4 10x buffer for restriction enzyme
- 3.5 10x PCR buffer
- 3.6 50 mM Magnesium chloride
- 3.7 Acrylamide
- 3.8 Agar powder
- 3.9 Agarose
- 3.10 Ammonium persulfate
- 3.11 Anti-Rabbit IgG (H+L)
- 3.12 *Bam*HI enzyme
- 3.13 Bio-Rad protein Assay dye reagent concentrate
- 3.14 Bis- acrylamide
- 3.15 Bovine serum albumin
- 3.16 Coomassie brilliant blue R-250
- 3.17 Glucose
- 3.18 Develop and Replenisher
- 3.19 di-Sodium-Hydrogen-Phosphate-Dihydrate
- 3.20 ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagents
- 3.21 Ethidium bromide
- 3.22 Ethyl alcohol
- 3.23 Ethylene diamine tetra-acetic acid
- 3.24 Fixer and Replenisher
- 3.25 Glacial acetic acid
- 3.26 Glycerol
- 3.27 Glycine
- 3.28 His-Tag Rabbit polyclonal antibody
- 3.29 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- 3.30 Mag-Bind® Endo-free Plasmid Mini Kit

- 3.31 Methanol
- 3.32 Phenylmethylsulfonyl fluoride
- 3.33 Polysorbate 20
- 3.34 Potassium chloride
- 3.35 Precision plus protein dual color standards
- 3.36 *SacI* enzyme
- 3.37 Skim milk powder
- 3.38 Sodium chloride
- 3.39 Sodium dihydrogen phosphate
- 3.40 Sodium Dodecyl Sulfate
- 3.41 Taq DNA polymerase
- 3.42 Tetramethyl ethylenediamine
- 3.43 Tris-base
- 3.44 Tryptone Type1 (Casitose Type-1)
- 3.45 *XhoI* enzyme
- 3.46 Yeast extract powder

4. ยาปฏิชีวนะ

- 4.1 Kanamycin (KA)

5. แบคทีเรีย

- 5.1 *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การตรวจสอบ *Suilysin* gene ใน recombinant plasmid vector

- 1.1 การสร้าง recombinant plasmid vector

ยีน *Suilysin* (Sly) ของ *Streptococcus suis* serotype 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 692–2182 ความยาว 1,491 คู่เบส (bp) ข้อมูลอ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank (Accession No. AY139032.2) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้เพื่อต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการแสดงออกของโปรตีน Sly ใน *E. coli* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวมีการปรับเปลี่ยน codon

usage ให้เหมาะสมกับระบบการแสดงออกใน *E. coli* โดยใช้โปรแกรม OptimumGene™ Codon Optimization Analysis (GenScript, USA) ในการออกแบบเพื่อสังเคราะห์ยีน ได้เต็มเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction sites) ที่เหมาะสมบริเวณปลาย 5' และ 3' เพื่อความสะดวกในการตัดต่อเข้าสู่ vector และมีการเติมลำดับ pelB signal peptide ที่บริเวณปลาย 5' ของยีน Suilysin เพื่อช่วยนำทางโปรตีนไปยังบริเวณ periplasm ของเซลล์ *E. coli* โดย pelB signal peptide มีความยาว 66 bp และมีลำดับหลังตำแหน่งตัด (after cleavage site) เพิ่มเติมอีก 6 bp รวมเป็น 72 bp จากนั้นทำการสังเคราะห์ลำดับยีน (synthetic fragment) โดยบริษัท GenScript, USA และตัดต่อเข้าสู่ vector pET28a ซึ่งเป็น vector สำหรับการแสดงออกของโปรตีนโครงสร้างของ recombinant plasmid แสดงในภาพที่ 11 รายละเอียดชิ้นส่วนของยีนแสดงดังต่อไปนี้

1.1.1 pET28a–pelB–Sly = *Bam*HI–pelB Signal peptide–*Sac*I–Suilysin–*Xho*I ใน pET28a

DNA insertion (1,581 bp) + pET28a (5,369 bp) = 6,950 bp

ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในข้อ 1.1.4

1.1.2 pET28a–Sly = *Sac*I–Suilysin–*Xho*I ใน pET28a

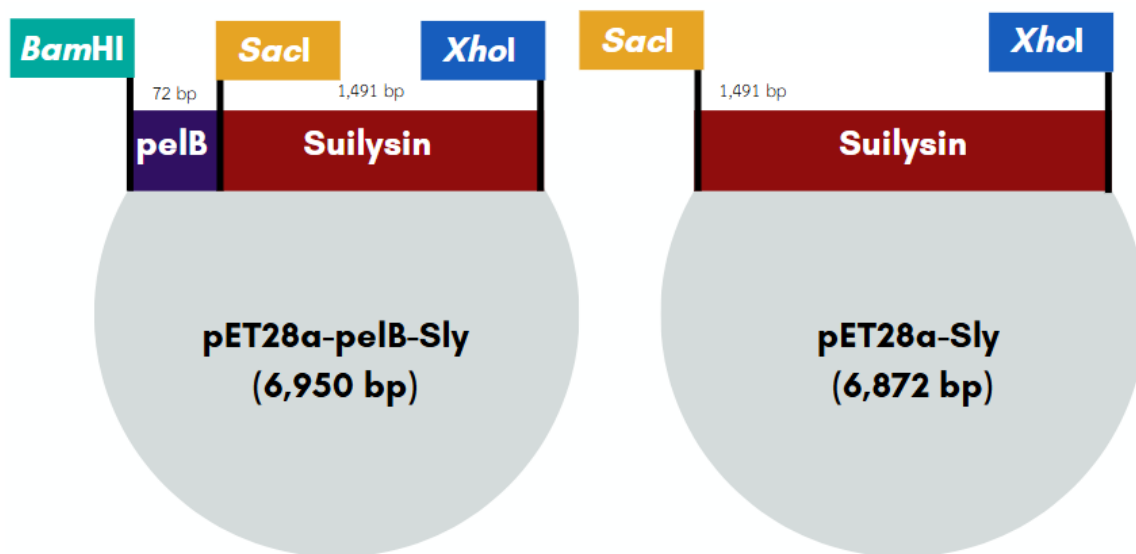
DNA insertion (1,503 bp) + pET28a (5,369 bp) = 6,872 bp

ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในข้อ 1.1.5 (GenBank Accession no. PP768788.1)

1.1.3 pET28a = control vector (เวกเตอร์เปล่า)

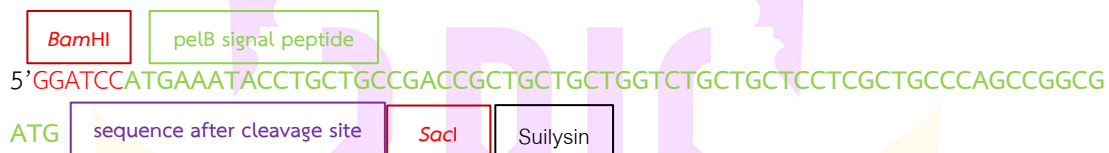
pET28a = 5,369 bp

นำชิ้นส่วนยีนสังเคราะห์ (synthetic fragment) ทั้งสองตัวอย่างตัดต่อเข้าไปใน pET28a vector รวมทั้ง pET28a (vector เปล่า) ฝากถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (cloning host) โดยวิธี Heat shock จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มียีนเป้าหมาย (transformed colonies) ด้วยยาปฏิชีวนะ Kanamycin (KA) ซึ่งตรงกับ Antibiotics resistance gene ของเวกเตอร์ ทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยการสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดจากโคโลนีที่คัดเลือกได้ และตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม เมื่อได้โคโลนีที่มียีนเป้าหมายของ recombinant plasmid vector ที่ต้องการของ pET28a–pelB–Sly, pET28a–Sly และ pET28a (vector เปล่า) ที่อยู่ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α นำโคโลนีเหล่านี้ ฝากถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน (expression host) โดยวิธี Heat shock เช่นเดียวกัน จากนั้นตรวจสอบ recombinant plasmid vector ในโคโลนีที่ได้ด้วยวิธีเดียวกันกับที่ตรวจสอบยีน ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และเก็บรักษาโคโลนีที่มียีนเป้าหมายที่อุณหภูมิ -20°C



ภาพ 11 แผนภาพแสดง recombinant plasmid vector A : pET28α-pelB-Sly และ B : pET28α-Sly

1.1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ suilysin ที่มี pelB signal peptide เมื่อตัดต่อเข้าไปยัง pET28α ได้เป็น pET28α-pelB-sly



GGATATCGAGCTCCGAAAAGCAGCCACCTGATTCTGAGCAGCATTGTTAGCCTGGCGCTGGTTGGCGTTAC
 CCCGCTGAGCGTTCTGGCGGATAGCAAGCAGGACATCAACCAGTACTTCCAAAGCCTGACCTATGAGCCGCAA
 GAAATCCTGACCAACGAGGGTGAATACATTGATAACCCGCCGGCGACCAACCGGTATGCTGGAGAACGGCCGTT
 TTGTGGTTCTGCGTCGTGAAAAGAAAAACATCACCAACAACAGCGCGGACATCGCGGTGATTGATGCGAAGGC
 GGCGAACATTTATCCGGGTGCGTGTGCGTGCGGACCAGAACCTGCTGGATAACAACCCGACCCTGATCAGC
 ATTGCGCGTGGCGACCTGACCCTGAGCCTGAACCTGCCGGGTCTGGCGAACGGTGATAGCCACACCGTGGTTA
 ACAGCCCGACCCGTAGCACCGTGCGTACCGGCGTTAACACCTGCTGAGCAAGTGGAACAACACCTACGCGGG
 CGAGTATGGCAACACCCAGGCGGAGCTGCAATACGACGAGACGATGGCGTATAGCATGAGCCAGCTGAAAAC
 CAAGTTCGGCACCAGCTTCGAGAAAATCGCGGTGCCGTGGACATTAACCTCGATGCGGTTAACAGCGGCGAA
 AAGCAGGTGCAAATCGTTAACTTCAAGCAAATTTACTACACCGTGAGCGTTGACGAGCCGGAAGCCCGAGCA
 AACTGTTGCGGAGGGCACCACCGTTAAGAACCTGAAACGTAACGGCATCACCGATGAAGTGCCGCCGGTGTA
 CGTTAGCAGCGTTAGCTATGGTCGTAGCATGTTCAATTAAGCTGGAACACAGCAGCCGTAGCACCCAGGTGCAA
 GCGGCGTTTAAGGCGGCGATCAAAGGTGTTGACATTAGCGGCAACGCGGAATACCAGGACATCCTGAAAAACA
 CCAGCTTCAGCGGTATATTTTTGGTGGCGACGCGGTAGCGCGGCGACCGTGGTTAGCGGCAACATCGAAAC

CCTGAAGAAAATCATTGAGGAAGGTGCGCGTTATGGCAAGCTGAACCCGGGTGTGCCGATTAGCTATAGCACC
AACTTTGTTAAAGACAACCGTCCGGCGCAAATCCTGAGCAACAGCGAGTACATTGAAACCACCAGCACCGTGC
ACAACAGCAGCGCGCTGACCCTGGATCACAGCGGTGCGTACGTTGCGAAGTATAACATCACCTGGGAGGAAGT
GAGCTATAACGAGGCGGGCGAGGAAGTTTGGGAACCGAAGGCGTGGGATAAAAACGGCGTGAACCTGACCAG
CCACTGGAGCGAAACCATCCAGATTCCGGGTAACGCGCGTAACCTGCACGTTAACATCCAAGAATGCACCGGC
CTGGCGTGGGAATGGTGGCGTACCGTGTACGACAAGGACCTGCCGCTGGTTGGT

Stop codon

XhoI

CAGCGCAAGATTACCATTGTTGGGGCACCACCCTGTACCCGCAATACGCGGATGAAGTGATTGAATAACTCTGAG 3'

1.1.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ suilysin ที่ไม่มี pelB signal peptide เมื่อตัดต่อเข้าไปยัง pET28α ได้เป็น pET28α-sly

SacI

Suilysin

5'GAGCTCCGCAAAAGCAGCCACCTGATTCTGAGCAGCATTGTTAGCCTGGCGCTGGTTGGCGTTACCCCGCT
GAGCGTTCTGGCGGATAGCAAGCAGGACATCAACCAGTACTTCAAAGCCTGACCTATGAGCCGCAAGAAATC
CTGACCAACGAGGGTGAATACATTGATAACCCGCCGGCGACACCGGTATGCTGGAGAACGGCCGTTTTGTGG
TTCTGCGTCGTGAAAAGAAAAACATCACCAACAACAGCGCGGACATCGCGGTGATTGATGCGAAGGCGGCGAA
CATTTATCCGGGTGCGCTGCTGCGTGCGGACCAGAACCTGCTGGATAACAACCCGACCTGATCAGCATTGCG
CGTGGCGACCTGACCCTGAGCCTGAACCTGCCGGTCTGGCGAACGGTGATAGCCACACCGTGGTTAACAGCC
CGACCCGTAGCACCGTGCGTACCGGCGTTAAACCTGCTGAGCAAGTGGAACAACCTACGCGGGCGAGTA
TGGCAACACCCAGGCGGAGCTGCAATACGACGAGACGATGGCGTATAGCATGAGCCAGCTGAAAACCAAGTTC
GGCACCAGCTTCGAGAAAATCGCGGTGCCGCTGGACATTAACCTCGATGCGGTAAACAGCGGCGAAAAGCAGG
TGCAAATCGTTAACTTCAAGCAAATTTACTACACCGTGAGCGTTGACGAGCCGAAAGCCCGAGCAAAGTGT
CGCGGAGGGCACCACCGTTAAGAACCTGAAACGTAACGGCATCACCGATGAAGTGCCGCCGGTGTACGTTAGC
AGCGTTAGCTATGGTCGTAGCATGTTTATTAAGCTGGAACACAGCAGCCGTAGCACCCAGGTGCAAGCGGCGT
TTAAGGCGGCGATCAAAGGTGTTGACATTAGCGGCAACGCGGAATACCAGGACATCCTGAAAAACACCAGCTT
CAGCGCGTATATTTTTGGTGGCGACGCGGGTAGCGCGGCGACCGTGGTTAGCGGCAACATCGAAACCTGAAG
AAAATCATTGAGGAAGGTGCGCGTTATGGCAAGCTGAACCCGGGTGTGCCGATTAGCTATAGCACCAACTTTG
TTAAAGACAACCGTCCGGCGCAAATCCTGAGCAACAGCGAGTACATTGAAACCACCAGCACCGTGCACAACAG
CAGCGCGCTGACCCTGGATCACAGCGGTGCGTACGTTGCGAAGTATAACATCACCTGGGAGGAAGTGAGCTAT
AACGAGGCGGGCGAGGAAGTTTGGGAACCGAAGGCGTGGGATAAAAACGGCGTGAACCTGACCAGCCACTGG
AGCGAAACCATCCAGATTCCGGGTAACGCGCGTAACCTGCACGTTAACATCCAAGAATGCACCGGCCTGGCGT
GGGAATGGTGGCGTACCGTGTACGACAAGGACCTGCCGCTGGTTGGTCAGCGC

Stop codon

XhoI

AAGATTACCATTGTTGGGGCACCACCCTGTACCCGCAATACGCGGATGAAGTGATTGAATAACTCTGAG 3'

1.2 การตรวจสอบ recombinant plasmid vector

นำตัวอย่างโคโลนีของ pET28a-pelB-Sly, pET28a-Sly และ pET28a ที่อยู่ใน *E. coli* BL21 (DE3) มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml 2x yeast extract tryptone (2xYT) สูตรอาหารที่มีปริมาณ tryptone และ yeast extract สูงกว่า LB ซึ่งส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้เร็วและหนาแน่นกว่า (Paul, 2014) ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง 2xYT ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นนำโคโลนีจากอาหารแข็ง มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml 2xYT ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

สกัด plasmid DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Mag-Bind® Endo-free Plasmid Mini Kit (Omega Bio-tec, USA) ตรวจสอบขนาดของ pET28a-pelB-Sly pET28a-Sly หรือ pET28a ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis ด้วย 0.7% agarose กำลังไฟ 100 Volts ระยะเวลา 30 นาที ย้อมด้วยเอทีเดียมโบมายด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel document ภายใต้ UV-Transilluminator

ตรวจสอบยืนยันโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จำเพาะกับแต่ละตัวอย่าง (ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5) จากนั้นบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 °C สำหรับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด และ 2 ชนิด ตามลำดับ ตรวจสอบผลการทดลองด้วย Gel Electrophoresis

ตาราง 4 ปฏิบัติการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด

Enzyme	Component	Volume
<i>Xho</i> I	1. 10x buffer for <i>Xho</i> I	1 μ l
	2. Enzyme <i>Xho</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
	3. Plasmid DNA	1,000 ng
	4. Autoclave distilled water	Add to total volume 10 μ l
	Total	10 μ l
<i>Sac</i> I	1. 10x buffer for <i>Sac</i> I	1 μ l
	2. Enzyme <i>Sac</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
	3. Plasmid DNA	1,000 ng
	4. Autoclave distilled water	Add to total volume 10 μ l
	Total	10 μ l
<i>Bam</i> HI	1. 10x buffer for <i>Bam</i> HI	1 μ l
	2. Enzyme <i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	1 μ l
	3. Plasmid DNA	1,000 ng
	4. Autoclave distilled water	Add to total volume 10 μ l
	Total	10 μ l

ตาราง 5 ปฏิบัติการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

Enzymes	Component	Volume (ul)
<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I	1. 10x buffer <i>Bam</i> HI	1 μ l
	2. Enzyme <i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	1 μ l
	3. Enzyme <i>Xho</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
	4. Plasmid DNA	2,000 ng
	5. Autoclave distilled water	Add to total volume 10 μ l
	Total	10 μ l
<i>Sac</i> I/ <i>Xho</i> I	1. 10x buffer <i>Sac</i> I	2 μ l
	2. Enzyme <i>Sac</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
	3. Enzyme <i>Xho</i> I (10 U/ μ l)	1 μ l
	4. Plasmid DNA	2,000 ng
	5. Autoclave distilled water	Add to total volume 10 μ l
	Total	10 μ l

การตรวจสอบชิ้นยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ตารางที่ 6 และ 7) ด้วย primer pair (คู่ไพรเมอร์) ที่ถูกออกแบบขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบชิ้นยีน ไพรเมอร์สำหรับ Sly (SLY-ForCU1 และ SLY-RevCU1 : PCR product ประมาณ 1,100 bp) และ ไพรเมอร์สำหรับ pET28a (pET28a-For และ pET28a-Rev : PCR product ประมาณ 550 bp)

SLY-ForCU1 : ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ของ Sly

: 5'-GCA GCC ACC TGA TTC TGA GCA GCA TTG-3'

SLY-RevCU1 : รีเวิร์ดไพรเมอร์ของ Sly

: 5'-GGT GGC GTA CCG TGT ACG ACA AGG ACC TGC-3'

pET28a-For : ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ของ pET28a

: 5'-GGC GAT ATA GGC GCC AGC AAC CGC ACC TG-3'

pET28a-Rev : รีเวิร์ดไพรเมอร์ของ pET28a

: 5'-GT AGC GGT CAC GCT GCG CGT AAC CAC CAC-3'

ตาราง 6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Polymerase chain reaction

Reaction	
Component	Volume (μl)
1. 10x PCR buffer	2.5
2. 50mM MgCl ₂	0.75
3. 10mM dNTP mix	0.5
4. 10uM Forward primer	1.25
5. 10uM Reverse primer	1.25
6. <i>Taq</i> DNA polymerase	0.5
7. DNA template (50–500 ng/ μl)	1
8. Deionized water	17.25
Total	25

* ใส่ *Taq* DNA polymerase เป็นอันดับสุดท้าย

ตาราง 7 สภาวะที่ใช้ในการทำ Polymerase chain reaction

PCR Condition			
Stage 1	Step 1 initial denature	94 °C	2 min
Stage 2	Step 1 denature	94 °C	30 sec
	Step 2 annealing	58 °C	30 sec
	Step 3 extension	72 °C	1 min
30 cycles			
Stage 3	Step 1 final extension	72 °C	10 min

นำตัวอย่าง plasmid DNA ที่สกัดได้จากโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน โดยใช้ T7 promoter primer และ T7 terminator primer ที่มีอยู่ใน pET28a vector ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำโคโลนีที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องใช้ในการทดลองต่อไป

ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Sly เนื่องจาก vector ที่ใช้ pET28a เป็น T7 promoter ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้โดยใช้ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้ IPTG ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม รวมถึงศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังแสดงในการทดลองต่าง ๆ ในลำดับถัดไป

2. การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ในระบบการแสดงออกของ *E. coli*

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้โดยศึกษาผลของกลูโคสต่อการแสดงออก นำโคโลนี *E. coli* BL21 (DE3)-pET281-Sly (host cell ที่มี recombinant plasmid vector จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml Luria-Bertani broth (LB) ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อตั้งต้น 1% ลงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี 50 ug/ml KA บ่มที่ 37 °C , 120 rpm จนมีความหนาแน่นเซลล์ (OD_{600 nm}) ที่ 0.8 (Wattthanadirek, et al., 2018) จากนั้นเติม 1 mM IPTG ลงในอาหาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C , 120 rpm เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมกลูโคส และชุดการทดลองที่ 2 เติม 0.8 % กลูโคส

(Pinske, et al., 2011) ทำการวัดความหนาแน่นของเซลล์ ที่ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์หลังการเหนี่ยวนำ และนำตัวอย่างเซลล์ที่เจริญหลังการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ของแต่ละชุดการทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 mM Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ที่มี 1 M Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic homogenizer เติมน้ำ 30 วินาที และหยุดพัก 30 วินาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ความถี่ 70 % นำตัวอย่างที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 15 นาที ทิ้งส่วนตะกอน นำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 20 นาที ทิ้งส่วนตะกอน ส่วนใสที่ได้คือโปรตีนที่ละลายน้ำ นำโปรตีนที่ละลายน้ำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนและคำนวณปริมาณโปรตีน ตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนโดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blot analysis

3. การศึกษาอัตราการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly ที่เต็มและไม่เต็ม 0.8% กลูโคส

ศึกษาผลของกลูโคสต่อการเจริญของเซลล์ แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ *E. coli* BL21 (DE3) (host cell) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly (host cell ที่มี recombinant plasmid vector) ทำการทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อระหว่างสูตรอาหารที่เต็มและไม่เต็ม 0.8% กลูโคส ถ้ายเชื้อตั้งต้น 1% ลงในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 ug/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง ตั้งแต่ 0 – 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อด้วย Spectrophotometer (OD₆₀₀) และบันทึกผล จากนั้นสร้างกราฟเพื่อหาค่า Exponential phase แสดงการเจริญของเชื้อ

4. การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้โดยการนำ *E. coli* BL21 (DE3) (host cell) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml 2xYT ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ถ้ายเชื้อตั้งต้น 1 % ในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 µg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 120 rpm จนได้ค่าความขุ่นของเชื้อที่ OD₆₀₀ = 0.8 หลังจากนั้นแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองโดยที่ ชุดการทดลองที่ 1 เต็ม 0.8 % กลูโคส ร่วมกับสารเหนี่ยวนำ และชุดการทดลองที่ 2 เต็มสารเหนี่ยวนำเพียงอย่างเดียว โดยที่มีการศึกษาความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ และชุดการทดลองที่ 3 ชุดควบคุม เป็น host cell เปล่าที่ไม่มี recombinant plasmid

vector โดยไม่สารสารเหนี่ยวนำ (ตารางที่ 8) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C, 120 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 mM PBS pH 7.4 ที่มี 1 M PMSF ทำให้เซลล์แตก และเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ละลายน้ำได้ตั้งขั้นตอนการศึกษาในข้อ 2

ตาราง 8 แสดงตัวอย่างที่มีการเติมสารเหนี่ยวนำ IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น IPTG (mM)
2xYT+50mg/ml KA + 0.8% glucose	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pET28a-Sly	0
		0.5
		1
2xYT+50mg/ml KA +	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pET28a-Sly	0
		0.5
		1
2xYT	<i>E. coli</i> BL21(DE3) – expression host (Negative control)	0

5. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกต่อการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ โดยการนำ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml 2xYT ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 ug /ml KA ในปริมาณ 1% เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 ug/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 120 rpm จนได้ค่าความขุ่นของเชื้อที่ OD₆₀₀ = 0.8 และเติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 9, 12, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 mM PBS pH 7.4 ที่มี 1 M PMSF ทำให้เซลล์แตก และเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ละลายน้ำได้ตั้งขั้นตอนการศึกษาในข้อ 2

6. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกต่อการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ โดยการนำ *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-sly มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml 2xYT ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 ug /ml KA ในปริมาณ 1% เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 ug/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 120 rpm จนได้ค่าความขุ่นของเชื้อที่ OD₆₀₀ = 0.8 และเติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM ทำการทดลองโดยบ่มที่อุณหภูมิ 18 28 และ 37 °C, เขย่า 120 rpm เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง บั่นตกตะกอน และทำให้เซลล์แตก จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 mM PBS pH 7.4 ที่มี 1 M PMSF ทำให้เซลล์แตก และเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ละลายน้ำได้ตั้งขั้นตอนการศึกษาในข้อ 2

7. การศึกษาผลของการเติม signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly

ศึกษาผลของการเติม pelB signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ โดยการเปรียบเทียบ 2 constructs คือ *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-pelB-Sly (มี pelB signal peptide) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-Sly (ไม่มี pelB signal peptide) โดยมี *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a เป็น control vector และ *E. coli* BL21(DE3) เป็น negative control นำโคโลนีของทั้ง 4 ตัวอย่าง มาเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ml 2xYT ที่มี 50 mg/ml KA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร 2xYT ที่มี 50 ug /ml KA ในปริมาณ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 120 rpm จนได้ค่าความขุ่นของเชื้อที่ OD₆₀₀ = 0.8 และเติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM บ่มต่อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง บั่นตกตะกอน จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 mM PBS pH 7.4 ที่มี 1 M PMSF ทำให้เซลล์แตก และเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ละลายน้ำได้ตั้งขั้นตอนการศึกษาในข้อ 2

8. การทำโปรตีนบริสุทธิ์

นำโคโลนี *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-Sly มาเลี้ยงเพื่อเตรียมตัวอย่างโปรตีนในระดับขยายขนาด ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml โดยเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 500 ml เตรียมตัวอย่างโปรตีนตามขั้นตอนเดียวกับที่ใช้ในการทดลองในข้อ 4 – 7 จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย concentrate column, Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 30 kDa MWCO (Millipore, Germany) และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ FF Column (Cytiva, United State) ขนาด 1 ml ซึ่งเป็นคอลัมน์สำเร็จรูป แพคด้วย Ni Sepharose™ 6 Fast Flow matrix ที่ใช้สำหรับการทำ histidine tag พิ่วชั้นโปรตีนสายผสมให้บริสุทธิ์ด้วย

เทคนิค Ni^{2+} -immobilized metal ion affinity chromatography (Ni^{2+} -IMAC) และชะโปรตีนที่ต้องการออกมาด้วย Imidazole

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ FF Column

8.1 ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized Water, DI) ด้วยไซริงค์ขนาด 5 ml จำนวน 15 ml โดยมีอัตราการไหล 1 ml/min

8.2 ปรับสมดุลคอลัมน์ด้วย 20 mM imidazole pH7.4 จำนวน 3 ml

8.3 คูตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย column concentrate มาไหลลงในคอลัมน์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 20 mM imidazole pH7.4 ปริมาตร 5 ml ได้ Unbound protein

8.4 ชะคอลัมน์ด้วย 20 mM imidazole buffer pH7.4 ปริมาตร 15 ml ได้ Wash fraction

8.5 ชะคอลัมน์ด้วย 50 mM imidazole buffer pH7.4 ปริมาตร 5 ml ได้ Elution fraction 50 mM imidazole

8.6 ชะคอลัมน์ด้วย 80 mM imidazole buffer pH7.4 ปริมาตร 5 ml ได้ Elution fraction 80 mM imidazole

8.7 ชะคอลัมน์ด้วย 100 mM imidazole buffer pH7.4 ปริมาตร 5 ml ได้ Elution fraction 100 mM imidazole

8.8 ชะคอลัมน์ด้วย 200 mM imidazole buffer pH7.4 ปริมาตร 5 ml ได้ Elution fraction 200 mM imidazole

8.9 ชะคอลัมน์ด้วย 300 mM imidazole buffer pH7.4 ปริมาตร 5 ml ได้ Elution fraction 300 mM imidazole

8.10 นำตัวอย่างที่ได้แต่ละ fraction ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย concentrate column บันทึกรายปริมาณที่เหลือ และตรวจวัดปริมาณโปรตีน

9. การวัดปริมาณโปรตีน

9.1 การวัดปริมาณโปรตีนด้วย Dye-binding assay

การทำการหามาตรฐานของปริมาณโปรตีน โดยที่มี Standard protein เป็น Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 2.0 mg/ml และเตรียม Bradford solution จาก Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA) ที่ทำการเจือจาง 5 เท่า (Bradford reagent 1 ml ผสมกับน้ำ 4 ml)

9.1.1 เตรียมหลอดขนาด 1.5 ml 7 หลอด จำนวน 3 ซ้ำ

9.1.2 เตรียม Standard protein solution และน้ำกลั่น ตามปริมาตรที่ระบุไว้ในตาราง อย่างแม่นยำที่สุด (ตารางที่ 9) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

9.1.3 เติม Bradford solution หลอดละ 980 μ l ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

9.1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และนำค่าที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่า OD₅₉₅ nm เป็นแกนตั้ง และค่าความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (mg/ml) เป็นแกนนอน สมการการคำนวณมีดังนี้

$$Y = AX+B$$

เมื่อ Y = ค่า OD₅₉₅ nm ที่วัดได้

A = ความชันของกราฟ (slope)

B = จุดตัดแกน Y (Y-intercept)

X = ความเข้มข้นของโปรตีน

$$\text{ดังนั้น } X = (Y-B)/A$$

9.2 การวัดความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีน โดยเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

9.2.1 เตรียมตัวอย่างโปรตีน 20 μ l และเติม Bradford solution หลอดละ 980 μ l ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที (ทำ 2 ซ้ำ)

9.2.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm อย่างไรก็ตาม หากพบว่าค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มากกว่าค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐานให้ทำการเจือจางให้เหมาะสม และทำการวัดค่าซ้ำใหม่

9.2.3 นำค่า OD₅₉₅ nm ของตัวอย่างที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณออกมาเป็นความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง โดยแทนค่าในสมการ $X = (Y-B)/A$

ตาราง 9 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน

หลอดที่	Std. protein (μl)	H ₂ O (μl)	Bradford Solution(μl)
Blank	0	20	980
1	2	18	980
2	4	16	980
3	6	14	980
4	8	12	980
5	10	10	980
6	12	8	980
7	14	6	980

10. การตรวจสอบคุณภาพโปรตีน

10.1 การตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนด้วย SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ขั้นตอนการเตรียมและรันเจล 12.5% SDS-PAGE

10.1.1 เตรียมเจลในส่วน Resolving gel และ Stacking gel ในหลอดทดลอง (ตารางที่ 10)

10.1.2 เซทกระจกสำหรับใส่เจล

10.1.3 ใส่ Resolving gel ลงไปด้านล่างโดยที่เหลือด้านบนไว้ 1 เซนติเมตร จากนั้นเติมน้ำให้เต็มเพื่อไม่ให้ผิวหน้าเจลสัมผัสกับอากาศ ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เจลเซตตัว

10.1.4 เทน้ำที่อยู่ด้านบนออกเติม Stacking gel ลงไปด้านบนพร้อมกับใส่ comb รอจนเจลเซตตัว นำ comb ออก

10.1.5 ขั้นตอนการรัน SDS-PAGE นำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบมาผสมกับ Protein sample loading buffer 5X ในอัตราส่วน 5:1 ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยกำลังไฟ 100-volt เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง โดยใช้ 12.5% SDS-PAGE ที่เตรียมได้และมี Protein running buffer เป็นตัวกลางนำกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue Stain solution โดยวางบนเครื่องผสมสารข้ามคืน จากนั้นล้างเจลด้วย Destain solution วางบนเครื่องผสมสารจนกว่าเจลจะใสเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

10.1.6 การใส่ตัวอย่างโปรตีนลงใน SDS-PAGE ในแต่ละชุดการทดลอง ทำการควบคุมปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่ใส่ในแต่ละเลนให้เท่ากัน โดยคำนวณจากความเข้มข้นต่ำสุดของแต่ละชุดการทดลอง คุณด้วย 30 μl ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงกว่า จะใช้ปริมาณที่น้อยกว่า

ตาราง 10 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE

Component	Volume (ml)	Component	Volume (ml)
Resolving gel (10 ml)		Stacking gel (5 ml)	
1. Distilled water	3.2	1. Distilled water	2.1
2. 30% Acrylamide	4.1	2. 30% Acrylamide	2.1
3. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5	3. 1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.63
4. 10% SDS	0.1	4. 10% SDS	0.05
5. 10% Ammonium persulfate	0.1	5. 10% Ammonium persulfate	0.1
6. TEMED*	0.005	6. TEMDE*	0.005

* N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine (TEMED) เติมลงในส่วนผสมเป็นอันดับสุดท้าย เพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยา polymerization

11. การตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนด้วย Western blot analysis

11.1 ทำการแยกโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE (ข้อ 10)

11.2 ย้ายโปรตีนจากเจลไปยัง Immobilon®-E polyvinylidene difluoride (PVDF) Transfer Membrane ด้วยเครื่อง Electro blot แบบ semi dry โดยมี Transfer buffer เป็นตัวกลางนำกระแสไฟฟ้า ด้วยกำลังไฟ 25-volt, 200 mA เป็นระยะเวลา 30 นาที

11.3 บล็อก PVDF membrane ด้วย 5% skim milk บนเครื่องเขย่าสาร เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

11.4 ล้าง PVDF membrane ด้วย wash buffer for Western blot analysis 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

11.5 เติม primary antibody, His-Tag Rabbit polyclonal antibody (Affinity Bioscience, UK) ใน 1% skim milk อัตราส่วน (1: 3,000 ul) บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C บนเครื่องเขย่าสาร

11.6 ล้าง PVDF membrane ด้วย wash buffer for Western blot analysis 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

11.7 เติม Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Inc., USA) ใน 1% skim milk อัตราส่วน (1: 2,000 ul) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าสาร

11.8 ล้าง PVDF membrane ด้วย wash buffer for Western blot analysis 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

11.9 ซับ PVDF membrane ให้แห้ง จากนั้นวาง PVDF membrane ลงบน Saran wrap ตรวจสอบปฏิกิริยาการจับกันของโปรตีนและ antibody ด้วย Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents (Cytiva, USA) อัตราส่วนน้ำยา A:B (400:400 μ l) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

11.10 นำ PVDF membrane ย้ายไปวางลงบน Saran wrap แผ่นใหม่ รีดให้เรียบ ไม่ให้มีฟองอากาศ

11.11 นำ PVDF membrane ที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้ว ไปวางบนฟิล์มเอกซเรย์ ที่วางไว้ในอุปกรณ์สำหรับประกบฟิล์ม (ทำในห้องมืด) ประกบฟิล์มเอกซเรย์ 3 นาที

11.12 นำฟิล์มเอกซเรย์ที่ประกบแล้วมาล้างด้วยน้ำยาล้างฟิล์ม ล้างน้ำให้สะอาดซับแผ่นฟิล์มจนแห้ง

11.13 ทำการวัดพื้นที่ของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ด้วยโปรแกรม ImageJ (<https://imagej.net/ij/>)

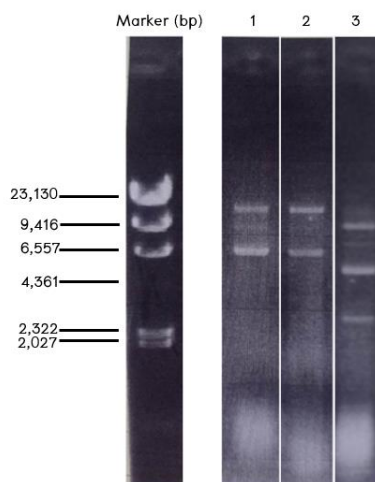


บทที่ 4

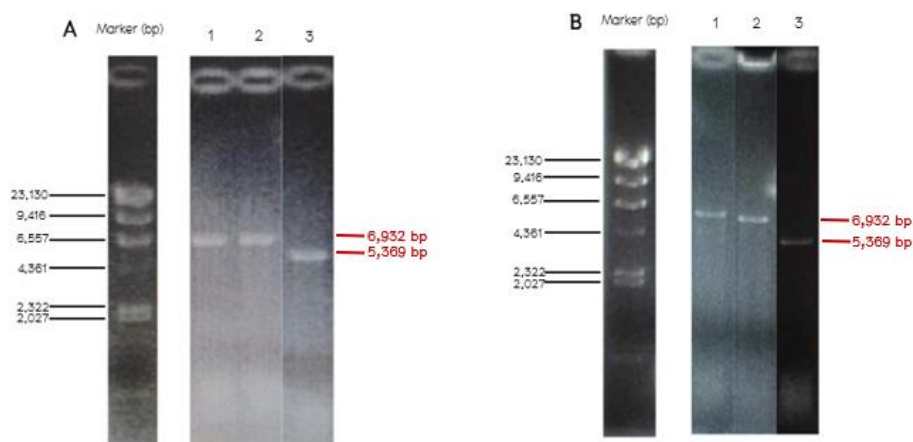
ผลการวิจัย

การตรวจสอบ Suilysin gene ใน recombinant plasmid vector

ทำการตรวจสอบยีนที่ศึกษา ได้แก่ Suilysin gene ที่อยู่ใน pET28a-pelB-Sly pET28a-Sly และ control vector: pET28a ที่ถ่ายฝากไว้ใน *E. coli* BL21 (DE3) เก็บรักษาไว้ที่ -20°C นำโคโลนีที่เก็บรักษาไว้มาเลี้ยงในอาหารเหลว สกัด plasmid DNA ตรวจสอบขนาดของ plasmid DNA และตรวจสอบยีนด้วย 2 วิธีคือ การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการทำ PCR ผลการศึกษาพบว่าของ plasmid DNA ที่ได้มีขนาดถูกต้องตามขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย และมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบหลักเมื่อยังไม่ได้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 12) จากนั้นนำ plasmid DNA ไปตรวจสอบต่อโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเอนไซม์เดี่ยวและเอนไซม์คู่ ผลการตัดด้วยเอนไซม์เดี่ยวทางด้าน N terminal แสดงในภาพที่ 13A ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์เดี่ยวด้าน C terminal แสดงในภาพที่ 13B ซึ่งเป็นการตัด plasmid DNA ให้เป็นเส้นตรง โดยมีขนาดตรงตามขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย กล่าวคือ pET28a-pelB-Sly มีขนาด 6,932 bp, pET28a-Sly มีขนาด 6,860 bp และ pET28a มีขนาด 5,369 bp ส่วนการตัด plasmid DNA ด้วยเอนไซม์คู่ในด้าน N และ C terminal โดยใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม ได้ยืนยัน Sly ขนาดประมาณ 1,500 bp และเวกเตอร์ขนาดประมาณ 5,369 bp ส่วน pET28a เป็นการตัดตัด plasmid DNA ให้เป็นเส้นตรง และมีส่วนที่ตัดไม่สมบูรณ์เหลืออยู่ด้วย (ภาพที่ 14) จากนั้นนำตัวอย่าง plasmid DNA ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ผลการตรวจสอบพบว่า pET28a-pelB-Sly และ pET28a-Sly มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1,100 bp และ pET28a มีขนาดประมาณ 550 bp (ภาพที่ 15) ซึ่งมีขนาดตรงตามขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอเป้าหมายเรียบร้อยแล้ว ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีน Sly ซึ่งผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง จึงทำการศึกษาต่อได้ นอกจากนี้ ยังได้ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน Sly แบบต้นแบบ (Sly-Original sequence) และแบบที่มีการดัดแปลงให้มี Codon usage เหมาะกับการแสดงออกใน *E. coli* (Sly-Codon usage) ดังแสดงในภาพที่ 16 และ 17 ตามลำดับ

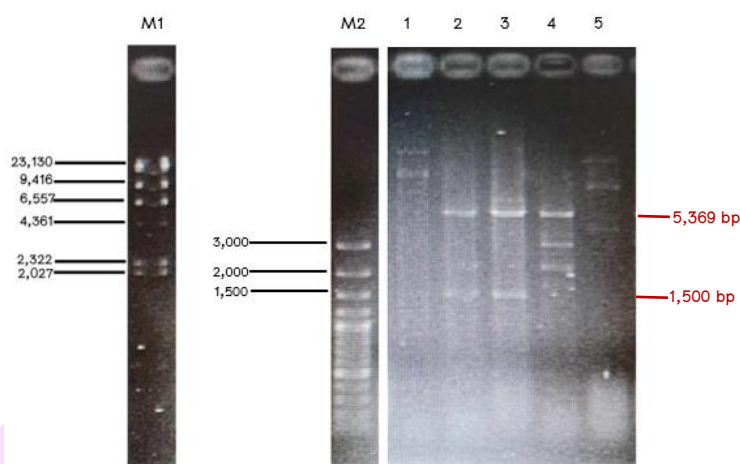


ภาพ 12 การตรวจสอบ plasmid DNA ด้วย 0.7% Agarose gel electrophoresis
Marker: λ -DNA HindIII DNA marker, 1: pET28a-pelB-Sly Colony 4, 2:
pET28a-Sly Colony 14 และ 3: pET28a Colony 9



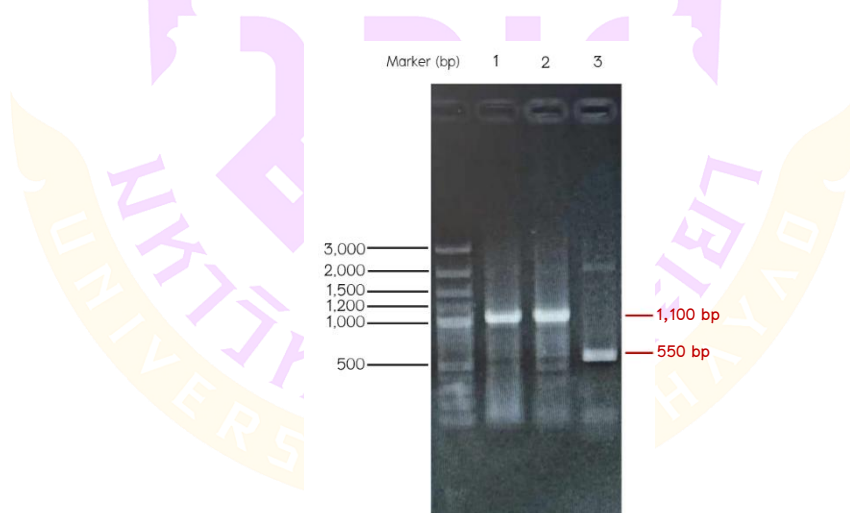
ภาพ 13 การตรวจสอบ plasmid DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์เดียว

ด้าน N terminal หรือ C terminal และตรวจสอบด้วย 0.7% Agarose gel electrophoresis
A: ด้าน N terminal; 1: pET28a-pelB-Sly Colony 4 ตัดด้วย BamHI, 2: pET28a-Sly Colony 14
ตัดด้วย SacI และ 3: pET28a Colony 9 ตัดด้วย XhoI, B : ด้าน C terminal; 1: pET28a-pelB-
Sly Colony 4, 2: pET28a-Sly Colony 14 และ 3: pET28a Colony 9 ตัดด้วย XhoI และ Marker:
 λ -DNA HindIII DNA marker



ภาพ 14 การตรวจสอบ plasmid DNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์คู่

ทั้ง N terminal และ C terminal และตรวจสอบด้วย 1% Agarose gel electrophoresis 1: uncut pET28a-pelB-Sly Colony 4, 2: pET28a-pelB-Sly Colony 4 ตัดด้วย *Bam*HI และ *Xho*I, 3: pET28a – Sly Colony 14 ตัดด้วย *Sac*I และ *Xho*I, 4: pET28a Colony 9 ตัดด้วย *Sac*I และ *Xho*I, 5: Uncut pET28a Colony 9, M1: λ -DNA *Hind*III DNA marker และ M2: 100 bp ladder plus DNA marker



ภาพ 15 การตรวจสอบ plasmid DNA ด้วยเทคนิค PCR และ 1% Agarose gel electrophoresis

1: pET28a-pelB-Sly Colony 4, 2: pET28a-Sly Colony 14, 3: pET28a Colony 9 และ Marker: 100 bp ladder plus DNA marker

Sly-Original sequence	1	AGAAAAAGTT CGCACTTGATTTTAAGCTCAATAGTCAGTT	40
Sly-Codon usage	1	CGCAAAAGCA GCCACCTGATTTCTGAGCAGCATTGTGTAGCC	40
Sly-Original sequence	41	TGGCACTCGT AGGGGTCACA CCATTGAGTG TTCTTGCAGA	80
Sly-Codon usage	41	TGGCGCTGGT TGGCGTTACC CGCTGAGCG TTCTGCGGA	80
Sly-Original sequence	81	TTCCAAACAA GATATTAAATCAGTATTTTCAAGCTTGACT	120
Sly-Codon usage	81	TAGCAAGCAG GACATCAACCAGTACTTCCAAGCCTGACC	120
Sly-Original sequence	121	TACGAGCCAC AAGAGATTCT TACAAATGAGGGAGAAATACA	160
Sly-Codon usage	121	TATGAGCCGC AAGAAATCCT GACCAACGAGGGTGAATACA	160
Sly-Original sequence	161	TTGATAATCC GCCAGCAACA ACTGGTATGT TAGAAAACGG	200
Sly-Codon usage	161	TTGATAACCC CCCGGCGACC ACCGGTATGC TGGACAACGG	200
Sly-Original sequence	201	ACGTTTGTGA GTACTTCGCA GAGAAAAGAA GAATATTACG	240
Sly-Codon usage	201	CCGTTTGTGT GTTCTGCGTC GTGAAAAGAA AAACATCACC	240
Sly-Original sequence	241	AACAATAGTG CAGATATTGC TGTATTGAT GCTAAGGCTG	280
Sly-Codon usage	241	AACAACAGCG CGGACATCGC GGTGATTGAT GCGAAGCGGG	280
Sly-Original sequence	281	CAAAATATTTA TCCAGGTGCT TTATTGCGTG CTGACCAAAA	320
Sly-Codon usage	281	CGAAATATTTA TCCGGGTGCG CTGCTGCGTG CGGACCAGAA	320
Sly-Original sequence	321	TCTTCTGGAT AATAATCCAA CGCTTATCAG TATTGCGGG	360
Sly-Codon usage	321	CCTGCTGGAT AACAAACCCG ACCTGATCAG CATTGCGGCT	360
Sly-Original sequence	361	GGAGATCTGA CGCTTAGTTT GAATTTACCT GGTTTGGCCA	400
Sly-Codon usage	361	GGCGAAGCTGA CCCTGAGCCT GAACCTGCCG GGTTCTGGCA	400
Sly-Original sequence	401	ATGGGATAG CCACACTGTT GTAAATTTCT CCAACAGAAG	440
Sly-Codon usage	401	ACGGTATAG CCACACCGTG GTTAAACAGCC CGACCCGTAG	440
Sly-Original sequence	441	TACTGTTCGA ACAGGGGTGAATAACCTTCTGTCTAAATGG	480
Sly-Codon usage	441	CACCGTTCGT ACCGGCGTTAACAACCTGCTGAGCAAGTGG	480
Sly-Original sequence	481	AATAATACGT ATGCTGGAGA GTATGGCAAT ACCCAAGCAG	520
Sly-Codon usage	481	AACAACACCT AC CGGGCGA GTATGGCAAC ACCCAGCGGG	520
Sly-Original sequence	521	AGCTTCAATA TGATGAAACA ATGGCATACAGTATGTCACA	560
Sly-Codon usage	521	AGCTGCAATA CGACGAGACG ATGGCGTATAGCATGAGCCA	560
Sly-Original sequence	561	ATTGAAAACG AAGTTTCGGAA COTCTTTTGA AAAAAATTGCT	600
Sly-Codon usage	561	GCTGAAAACG AAGTTTCGGCA CCAGCTTTCGA AAAAAATCGCG	600
Sly-Original sequence	601	GTACCATTAG ATATCAATTT TGATGCCGTG AATTTCGGGTG	640
Sly-Codon usage	601	GTGCCGCTGG ACATTAACCT CGATGCCGTT AACAGCGGCG	640
Sly-Original sequence	641	AAAAACAGGT TCAGATTGTT AACTTTAAAC AAATTTATTA	680
Sly-Codon usage	641	AAAACAGGT GCAAAATCGTT AACTTCAAGC AAATTTACTA	680
Sly-Original sequence	681	TACAGTTAGT GTTGATGAAC CAGAACTCTCCAAGCAAGCTT	720
Sly-Codon usage	681	CACCGTGAAC GTTGACGAGC CGGAAAGCCC GAGCAAACTG	720
Sly-Original sequence	721	TTTGCGGAAG GGCACACTGT AAAAAATTTG AAACGAAATG	760
Sly-Codon usage	721	TTGCGGAGGG GCACACCGT TAAGAACTTG AAACGTAACG	760

Sly-Original sequence	761	GGATAACAGATGAGGTCCCTCCTGTTTATGTTTCCAGCGT	800
Sly-Codon usage	761	GCATCACCGATGAAGTGCCGCCGCTGTACGTTAGCAGCGT	800
Sly-Original sequence	801	TTCTTATGGA CGCTCTATGTTTCATCAAGTTAGAACTAGC	840
Sly-Codon usage	801	TAGCTATGGT CGTAGCATGTTTCATTAAGCTGGAAACCAGC	840
Sly-Original sequence	841	AGTAGGAGTACCCAGTTCAAGCCGCAATTTAAAGCAGCCA	880
Sly-Codon usage	841	AGCCGTAGCA CCCAGGTGCAAGCGGCGTTTAAAGCGGCGA	880
Sly-Original sequence	881	TCAAAGGCGTTGATATTAGTGGCAATGCTGAGTATCAAGA	920
Sly-Codon usage	881	TCAAAGGTGTTGACATTAGCGGCAACCGGGAATACCAGGA	920
Sly-Original sequence	921	CATTCTGAAA AATACTTCATTCTCTGCTTATATTTTTGGT	960
Sly-Codon usage	921	CATCCTGAAA AACACCAGCTTCAGCCGCTATATTTTTGGT	960
Sly-Original sequence	961	GGGGATGCAGGTAGCGCGGCTACTGTTGTGAGCGGAAATA	1000
Sly-Codon usage	961	GGCGAGCGGGGTAGCGCGGCGACCGTGGTTAGCGGGAACA	1000
Sly-Original sequence	1001	TTGAAACACTGAAGAAGATTATTGAAGAAGGTGCAAGATA	1040
Sly-Codon usage	1001	TCGAAACCTGAAGAAATCATTGAGGAAGGTGCGCGTTA	1040
Sly-Original sequence	1041	CGGAAAACCTCAATCCAGGTGTTCCGATTTCGTATTCACCC	1080
Sly-Codon usage	1041	TGGCAAGCTGAACCCGGGTGTGCCGATTAGCTATAGCACC	1080
Sly-Original sequence	1081	AACTTTGTCA AAGACAATAGACCTGCTCAGATTTTGAGCA	1120
Sly-Codon usage	1081	AACTTTGTTA AAGACAACCGTCCGGCGCAATCCTGAGCA	1120
Sly-Original sequence	1121	ATTCAAGAGTACATAGAAACA ACTTCAACAGTCCATAATAG	1160
Sly-Codon usage	1121	ACAGCGAGTACATTGAAACCAACAGCACCGTGCACAACAG	1160
Sly-Original sequence	1161	CAGTGCATGTACATTGGATCATTCAGGTGCTTATGTTGCG	1200
Sly-Codon usage	1161	CAGCGCGCTGACCTGGATCACAGCGGTGCGTACGTTGCG	1200
Sly-Original sequence	1201	AAATACAACA TTACTTGGGAAGAAGTATCTTACAATGAAG	1240
Sly-Codon usage	1201	AAGTATAACA TCACCTGGGA GGAAGTGAGCTATTAACGAGG	1240
Sly-Original sequence	1241	CTGGAGAAGAAGTTTGGGAA CCAAAAAGCTTGGGATAAGAA	1280
Sly-Codon usage	1241	CGGGCGAGGAAGTTTGGGAA CCGAAGGCGTGGGATAAAAA	1280
Sly-Original sequence	1281	TGGTGTAAATCTGACCTCACACTGGAGTGA AACCATTCAA	1320
Sly-Codon usage	1281	CGGCGTGAACTGACCAGCCACTGGAGCGA AACCATCCAG	1320
Sly-Original sequence	1321	ATTCCAGGAATGCTCGCAA TCTTCATGTCAAATATCAAG	1360
Sly-Codon usage	1321	ATTCCGGGTAAACGCGGTAACTGCACGTTAACAATCCAAG	1360
Sly-Original sequence	1361	AATGTACAGGATTAGCATGGGAGTGGTGGAGAACAGTTTA	1400
Sly-Codon usage	1361	AATGCACCGGCTTGGCGTGGGAATGGTGGCTACCGTGTA	1400
Sly-Original sequence	1401	TGACAAAGATTTACCAGTGTGGTCAACGTAAATAAACC	1440
Sly-Codon usage	1401	CGACAAGGACCTGCCGCTGTGGTTCAGCGCAAGATTACC	1440
Sly-Original sequence	1441	ATCTGGGGAA CAACGTTATA CCCACAGTATGCGGATGAGG	1480
Sly-Codon usage	1441	ATTTGGGGCAACACCTGTATCCCGCAATACGCGGATGAAG	1480
Sly-Original sequence	1481	TGATTGAGTAA 1491	
Sly-Codon usage	1481	TGATTGAATAA 1491	

ภาพ 16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Sly แบบต้นแบบ (Sly-Original sequence) และแบบที่มีการดัดแปลงให้มี Codon usage เหมาะกับการแสดงออกใน E. coli (Sly-Codon usage) โดยเว้นวรรคทุก ๆ 10 นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันจะเป็นช่องว่าง ส่วนที่เหมือนกันจะมีไฮไลต์ตามสีของแต่ละนิวคลีโอไทด์ A T C G สีเขียว สีแดง สีนํ้าเงิน และสีดำตามลำดับ

Sly-Ori seq amino acid	1	RKSSHLILSS IVSLALVGV T PLSVLADSKQ DINQYFQSLT YEPQEILTNE
Sly-Codon U amino acid	1	RKSSHLILSS IVSLALVGV T PLSVLADSKQ DINQYFQSLT YEPQEILTNE
Sly-Ori seq amino acid	51	GEYIDNPPAT TGMLENGRFV VLRREKKNIT NNSADIAVID AKAANIYPGA
Sly-Codon U amino acid	51	GEYIDNPPAT TGMLENGRFV VLRREKKNIT NNSADIAVID AKAANIYPGA
Sly-Ori seq amino acid	101	LLRADQNLLD NNPTLISIAR GDLTSLNLP GLANGDSHTV VNSPTRSTVR
Sly-Codon U amino acid	101	LLRADQNLLD NNPTLISIAR GDLTSLNLP GLANGDSHTV VNSPTRSTVR
Sly-Ori seq amino acid	151	TGVNNLLSKW NNTYAGEYGN TQAE LQYDET MAYSMSQLKT KFGTSFEKIA
Sly-Codon U amino acid	151	TGVNNLLSKW NNTYAGEYGN TQAE LQYDET MAYSMSQLKT KFGTSFEKIA
Sly-Ori seq amino acid	201	VPLDINFDAV NSGEKQVQIV NFKQIYYTVS VDEPESPSKL FAEGTTVKNL
Sly-Codon U amino acid	201	VPLDINFDAV NSGEKQVQIV NFKQIYYTVS VDEPESPSKL FAEGTTVKNL
Sly-Ori seq amino acid	251	KRNGITDEVP PVYVSSVSYG RSMFIKLETS SRSTQVQAAF KAAIKGVDIS
Sly-Codon U amino acid	251	KRNGITDEVP PVYVSSVSYG RSMFIKLETS SRSTQVQAAF KAAIKGVDIS
Sly-Ori seq amino acid	301	GNAEYQDILK NTSFSAYIFG GDAGSAATVV SGNIETLKKI IEEGARYGKL
Sly-Codon U amino acid	301	GNAEYQDILK NTSFSAYIFG GDAGSAATVV SGNIETLKKI IEEGARYGKL
Sly-Ori seq amino acid	351	NPGVPISYST NFVKDNRP AQ ILSNSEYIET TSTVHNSSAL TLDHSGAYVA
Sly-Codon U amino acid	351	NPGVPISYST NFVKDNRP AQ ILSNSEYIET TSTVHNSSAL TLDHSGAYVA
Sly-Ori seq amino acid	401	KYNITWEEVS YNEAGEEVWE PKAWDKNGVN LTSHWSETIQ IPGNARNLHV
Sly-Codon U amino acid	401	KYNITWEEVS YNEAGEEVWE PKAWDKNGVN LTSHWSETIQ IPGNARNLHV
Sly-Ori seq amino acid	451	NIQECTGLAW EWWRTVYDKD LPLVGQRKIT IWGTTLYPQY ADEVIE*
Sly-Codon U amino acid	451	NIQECTGLAW EWWRTVYDKD LPLVGQRKIT IWGTTLYPQY ADEVIE*

ภาพ 17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Sly ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบต้นฉบับ (Sly-Original sequence amino acid) และแบบที่มีการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มี Codon usage เหมาะกับการแสดงออกใน E. coli (Sly-Codon usage amino acid) * : stop codon

การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ในระบบการแสดงออกของ *E. coli*

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้โดยศึกษาผลของกลูโคสต่อการแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly ซึ่งทำการเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมกลูโคส และชุดการทดลองที่ 2 เติม 0.8% กลูโคส ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 18 โดยพบว่าทั้งสองชุดการทดลองมีการผลิตพิวซ์โปรตีน Sly-Histidine tag ที่มีขนาด 54 kDa โดยพบว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมกลูโคส มีการผลิตโปรตีน Sly ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ส่วนในชุดการทดลองที่เติมกลูโคส ผลิตโปรตีน Sly ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 นอกจากนี้ เมื่อวัดพื้นที่ของโปรตีน Sly ที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ด้วย โปรแกรม ImageJ แถบพิวซ์โปรตีน Sly-Histidine tag (54 kDa) พบได้มากที่สุดในตัวอย่างโปรตีนที่ 6 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำในทั้งสองชุดการทดลองโดยมีขนาดพื้นที่เท่ากับ 31,380, 40,467 และ 73,416 ในตัวอย่างที่ไม่เติมกลูโคสของชั่วโมงที่ 2, 4 และ 6 ตามลำดับ และขนาดพื้นที่เท่ากับ 57,595 และ 64,614 ในตัวอย่างที่เติมกลูโคสของชั่วโมงที่ 4 และ 6 ตามลำดับ

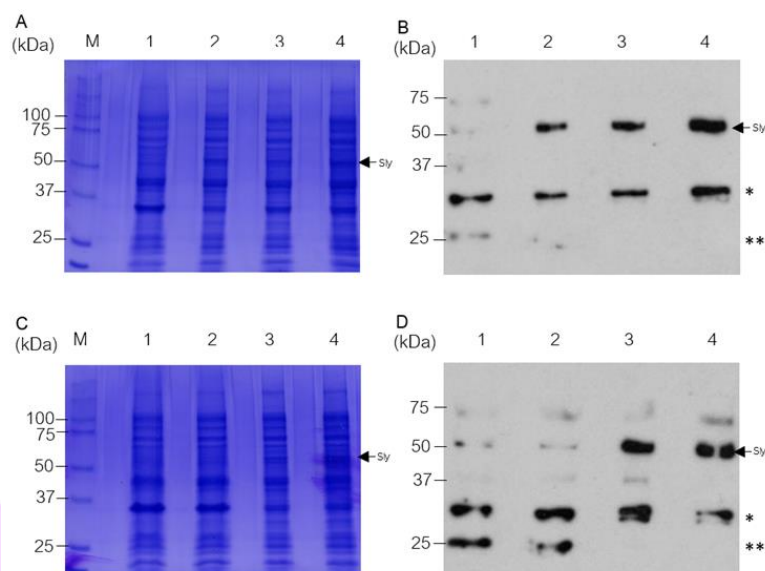
ตาราง 11 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้จากสูตรอาหารที่มีการเติมและไม่เติมกลูโคสต่อระยะเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	OD 595 nm (Y)	$X = (Y - 0.1417) / 44.25^*$	ความเข้มข้น ของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)**	หมายเหตุ
pET28a-Sly	0	0.56	0.009	0.047	เจือจาง 5 เท่า
pET28a-Sly	2	0.89	0.017	0.338	เจือจาง 20 เท่า
pET28a-Sly	4	0.82	0.015	0.153	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	6	1.07	0.021	0.210	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly + glucose	0	0.36	0.005	0.025***	เจือจาง 5 เท่า
pET28a-Sly + glucose	2	0.41	0.006	0.030	เจือจาง 5 เท่า
pET28a-Sly + glucose	4	1.17	0.023	0.232	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly + glucose	6	0.79	0.015	0.146	เจือจาง 10 เท่า

* ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

* ความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน = $X \times$ ความเจือจาง

*** ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำที่สุดในชุดการทดลองนี้ โดยใช้ 30 $\mu\text{l}/\text{lane}$ = 0.75 μg

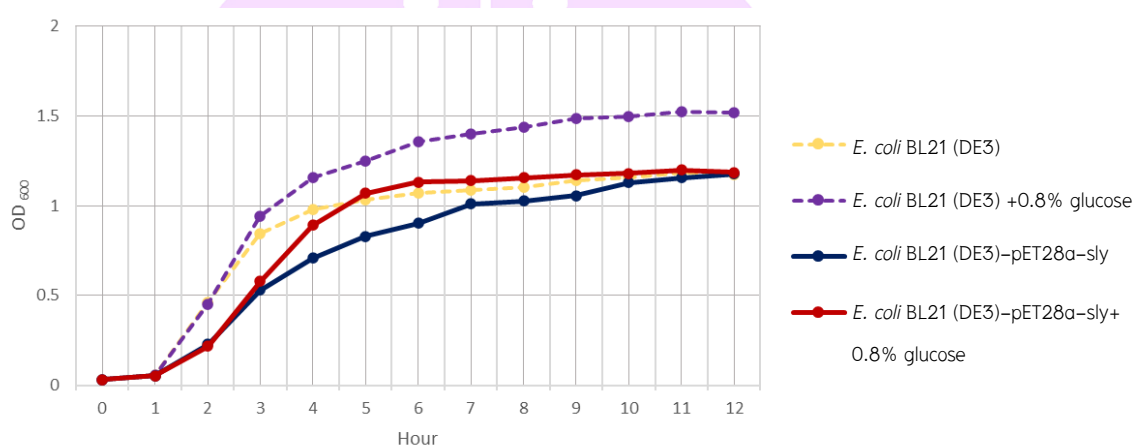


ภาพ 18 การศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ของ pET28α-Sly ที่อยู่ใน *E. coli* BL21 (DE3) โปรตีนที่ละลายน้ำได้ (0.75 μg) ของ *E. coli* lysates ที่เหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG บ่มที่ 28 °C เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบด้วย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue Stain solution (A และ C) และ Western blot analysis ด้วย anti-Histidine tag antibody (B และ D) การทดลองที่ไม่มีการเติมกลูโคส (A และ B) การทดลองที่มีการเติม 0.8% กลูโคส (C และ D) 1, 2, 3 และ 4 เป็นตัวอย่างของเวลาที่ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ, M : Precision plus protein dual color standards (Bio-Rad, Australia), ลูกศร : Sly ขนาด 54 kDa, * : non specific โปรตีน ขนาด 31 kDa และ ** : non specific โปรตีน ขนาด 25 kDa

การศึกษ้อัตราการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28α-sly ที่เติมและไม่เติมกลูโคส

ศึกษาผลของกลูโคสต่อการเจริญของเซลล์ แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28α-sly และแต่ละชุดการทดลอง ทำทดลองสองแบบ คือ เติมน้ำตาลและไม่เติมน้ำตาล 0.8% กลูโคส ทำการศึกษาดังต่อไปนี้ 2 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 19 ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) จะเจริญได้ดีกว่าอัตราการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28α-sly และในสูตรอาหารที่มีการเติมน้ำตาล 0.8% กลูโคส มีอัตราการเจริญที่ดีกว่าสูตรที่ไม่เติมน้ำตาล โดยในช่วง 3 ชั่วโมงแรก อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีการเติมน้ำตาล

และไม่มีการเติมกลูโคสมีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกันในทั้งสองชุดการทดลอง หลัง 3 ชั่วโมง อัตราการเจริญมีความแตกต่างกันในตัวอย่างที่มีการเติมและไม่มีการเติมกลูโคส อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 12 ในชุดการทดลอง *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly ในตัวอย่างที่มีการเติมและไม่เติมน้ำตาล และชุดการทดลอง *E. coli* BL21 (DE3) ที่ไม่มีการเติมน้ำตาล มีค่าใกล้เคียงกันมาก ในขณะที่ ตัวอย่าง *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีการเติมน้ำตาล ในชั่วโมงที่ 12 มีอัตราการเจริญดีที่สุด



ภาพ 19 กราฟแสดงอัตราการเจริญของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly ในอาหารสูตร 2xYT ที่เติมและไม่เติม 0.8% กลูโคส

การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 เติม 0.8% กลูโคส ร่วมกับสารเหนี่ยวนำ IPTG ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mM ชุดการทดลองที่ 2 เติมสารเหนี่ยวนำ IPTG เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mM และชุดการทดลองที่ 3 ชุดควบคุมเป็น host cell เปล่า และไม่เติมสารเหนี่ยวนำ นำโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจสอบขนาดของ Histidine tag-Sly พิสูจน์โปรตีนด้วย Western blot analysis ผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกลูโคสและชุดควบคุม เมื่อตรวจสอบด้วย Western blot analysis ไม่มีการผลิตโปรตีน Sly จึงไม่นำผลการศึกษามาแสดง ส่วนผลการศึกษาของชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกลูโคส แสดงดังภาพที่ 20 ซึ่งพบว่า เมื่อเหนี่ยวนำ

การแสดงผลด้วย 0, 0.5 และ 1 mM IPTG วัดพื้นที่ของโปรตีน Sly ที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ด้วยโปรแกรม ImageJ มีขนาดพื้นที่เท่ากับ 77,517, 127,926 และ 56,212 ตามลำดับ โดยที่ 0.5 mM IPTG (เลนที่ 2) ให้ผลดีที่สุด

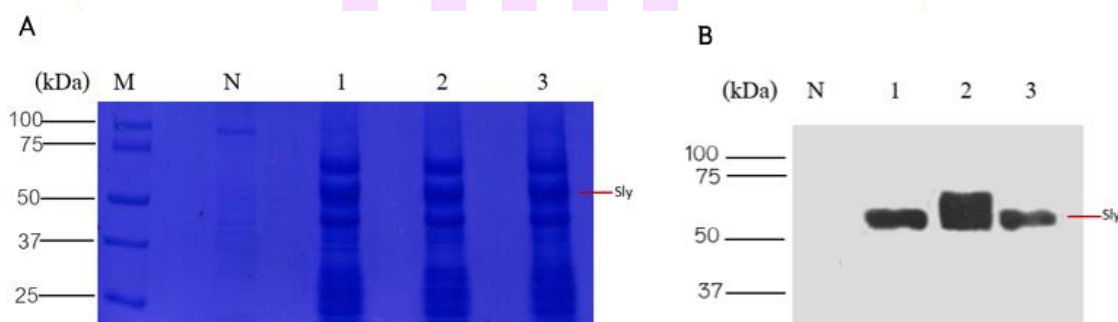
ตาราง 12 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้จากการเติมสารเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ (mM)	OD 595 nm (Y)	$X = (Y - 0.1133) / 45.298^*$	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)**	หมายเหตุ
pET28a-Sly	0	1.11	0.022	0.220	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	0.5	0.95	0.018	0.184	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	1	0.87	0.017	0.167***	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly + glucose	0	0.32	0.005	0.045	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly + glucose	0.5	0.8	0.015	0.001	
pET28a-Sly + glucose	1	0.35	0.005	0.051	เจือจาง 10 เท่า

* ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

* ความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน = $X \times$ ความเจือจาง

*** ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำที่สุดในชุดการทดลองนี้ โดยใช้ $30 \mu\text{l}/\text{lane} = 5 \mu\text{g}$



ภาพ 20 ผลของความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตโปรตีน Sly

ของ pET28a-Sly ที่อยู่ใน *E. coli* BL21 (DE3) โปรตีนที่ละลายน้ำได้ (5 μg) ของ *E. coli* lysates ไม่มีการเติมกลูโคส ที่บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้นแตกต่างกัน (A) : ตรวจสอบด้วย 12.5 % SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue Stain solution และ (B) : Western blot analysis ด้วย anti-Histidine tag antibody, N : *E. coli* BL21 (DE3) (negative control), 1, 2 และ 3 : *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-Sly เหนี่ยวนำด้วย 0, 0.5 และ 1 mM IPTG ตามลำดับ และ M : Precision plus protein dual color standards และลูกศร: Sly ขนาด 54 kDa

การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก เติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM ซึ่งให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 4 และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 9, 12, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง นำโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจสอบขนาดของ Histidine tag-Sly พิวชั้นโปรตีนด้วย Western blot analysis ผลการศึกษาพบว่า มีการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 โดยพบในปริมาณน้อยมากจนแทบจะไม่เห็นแถบโปรตีน เมื่อวัดพื้นที่ของโปรตีน Sly ที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ด้วยโปรแกรม ImageJ มีขนาดพื้นที่เท่ากับ 69,887, 119,364, 135,391 และ 135,252 ในตัวอย่างการบ่มเป็นเวลา 6, 9, 12 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพที่ 19 เลข 3, 4, 5 และ 6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการผลิตโปรตีน Sly เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 (ภาพที่ 21 เลข 6) และลดต่ำลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 15 ส่วนผลการตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot analysis ของตัวอย่างที่มีการบ่มเป็นเวลา 18, 21 และ 24 ชั่วโมงพบว่าการผลิตโปรตีน Sly ใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 15 แต่เนื่องจากมีแถบดำปนเปื้อนบนแผ่นฟิล์มเป็นจำนวนมากทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองมาแสดงและวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม ImageJ ได้ นอกจากนี้ ผลการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford method พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างการบ่มที่ชั่วโมงที่ 18, 21 และ 24 มีค่าลดลงจากชั่วโมงที่ 15 (ตารางที่ 13)

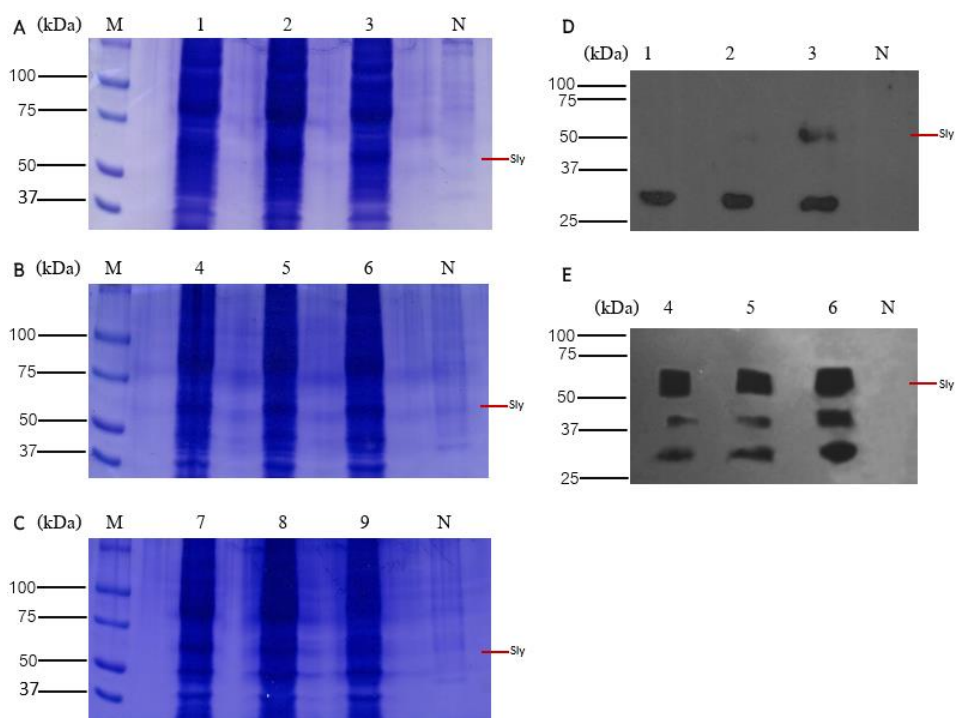
ตาราง 13 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลาที่เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ระยะเวลาหลังการ เหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	OD 595 nm (Y)	$X = (Y - 0.1438) / 46.272^*$	ความเข้มข้นของ โปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)**	หมายเหตุ
pET28a-Sly	0	0.778	0.014	0.137***	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	3	1.22	0.023	0.233	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	6	1.158	0.022	0.219	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	9	1.065	0.020	0.398	เจือจาง 20 เท่า
pET28a-Sly	12	1.098	0.021	0.412	เจือจาง 20 เท่า
pET28a-Sly	15	0.949	0.017	0.348	เจือจาง 20 เท่า
pET28a-Sly	18	0.947	0.017	0.347	เจือจาง 20 เท่า
pET28a-Sly	21	1.224	0.023	0.233	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	24	0.958	0.018	0.176	เจือจาง 10 เท่า

* ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

* ความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน = $X \times$ ความเจือจาง

*** ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำที่สุดในชุดการทดลองนี้ โดยใช้ 30 $\mu\text{l}/\text{lane}$ = 4.11 μg



ภาพ 21 การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิตโปรตีน Sly

ของ pET28a-Sly ที่อยู่ใน *E. coli* BL21 (DE3) โปรตีนที่ละลายน้ำได้ (4.11 μ g) ของ *E. coli* lysates ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.5 mM IPTG บ่มที่ 37 °C ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน นำมาตรวจสอบด้วย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue Stain solution (A B และ C) และ Western blot analysis ด้วย anti-Histidine tag antibody (D และ E); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 : ตัวอย่างของเวลาที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ, M : Precision plus protein dual color standards, ลูกศร : Sly ขนาด 54 kDa, * : non specific โปรตีน ขนาด 31 kDa และ ** : non specific โปรตีน ขนาด 43 kDa

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก เติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 18, 28 และ 37 °C นำโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาตรวจสอบใช้เทคนิค SDS-PAGE และ ตรวจสอบขนาดของ Histidine tag-Sly พิสูจน์โปรตีนด้วย Western blot analysis ผลการศึกษาพบว่า มีการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ในทุกอุณหภูมิ เมื่อวัดพื้นที่ของโปรตีน Sly ที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ด้วยโปรแกรม ImageJ มีขนาดพื้นที่

เท่ากับ 69,027, 143,559 และ 40,822 ในการทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 18, 28 และ 37 °C ตามลำดับ (ภาพที่ 22) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ดีที่สุดคือ 28 °C

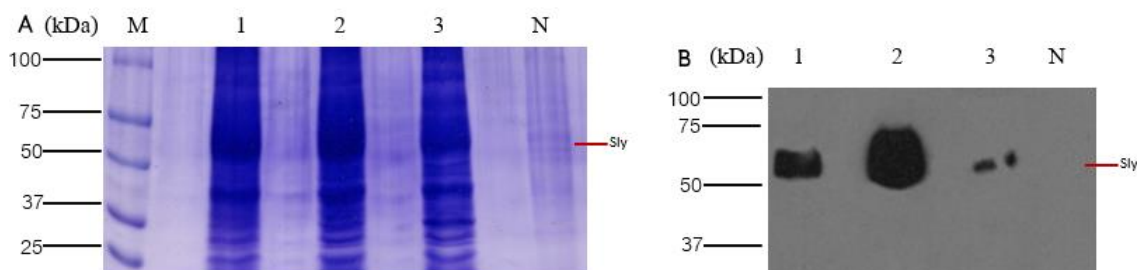
ตาราง 14 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ในแต่ละอุณหภูมิเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (C°)	OD 595 nm (Y)	$X=(Y-1916)/44.772^*$	ความเข้มข้น ของโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)**	หมายเหตุ
pET28a-Sly	18	0.738	0.122	0.122***	เจือจาง 10 เท่า
pET28a-Sly	28	1.134	0.421	0.421	เจือจาง 20 เท่า
pET28a-Sly	37	0.986	0.177	0.177	เจือจาง 10 เท่า

* ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

* ความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน = X * ความเจือจาง

*** ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำที่สุดในชุดการทดลองนี้ โดยใช้ 30 $\mu\text{l}/\text{lane}$ = 3.67 μg



ภาพ 22 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโปรตีน Sly ของ pET28a-Sly

ที่อยู่ใน *E. coli* BL21 (DE3) โปรตีนที่ละลายน้ำได้ (3.67 μg) ของ *E. coli* lysates ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.5 mM IPTG บ่มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน นำมาตรวจสอบด้วย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue Stain solution (A) และ Western blot analysis ด้วย anti-Histidine tag antibody (B); 1, 2 และ 3 : ตัวอย่างของอุณหภูมิที่ 18, 28 และ 37 °C, N : *E. coli* BL21(DE3) (Negative control), M : Precision plus protein dual color standards และ ลูกศร : Sly ขนาด 54 kDa

ศึกษาผลของการเติม signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้

ศึกษาผลของการเติม pelB signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก เติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM บ่มที่ 28 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบ 2 construct คือ *E. coli* BL21(DE3)-pET28α-pelB-Sly และ *E. coli* BL21(DE3)-pET28α-Sly นำโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาตรวจสอบใช้เทคนิค SDS-PAGE และ ตรวจสอบขนาดของ Histidine tag-Sly พิสูจน์โปรตีนด้วย Western blot analysis ผลการศึกษาพบว่าการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ในทั้งสองตัวอย่าง เมื่อวัดพื้นที่ของโปรตีน Sly ที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ด้วยโปรแกรม ImageJ มีขนาดพื้นที่เท่ากับ 81,181 และ 141,529 ในตัวอย่างที่มี pelB signal peptide (*E. coli* BL21(DE3)-pelB-pET28α-Sly) และไม่มี pelB signal peptide (*E. coli* BL21(DE3)-pET28α-Sly) ตามลำดับ (ภาพที่ 23) จากการทดลอง พบว่าตัวอย่างที่ไม่มี pelB signal peptide มีการผลิตโปรตีน Sly ที่มากกว่าตัวอย่างที่มี pelB signal peptide ส่วนตัวอย่าง control vector และ host cell negative control ไม่พบโปรตีนขนาด 54 kDa

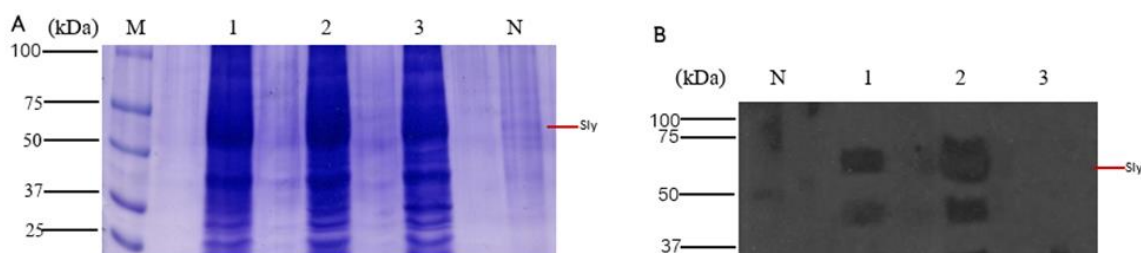
ตาราง 15 ผลการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ในการทดลองการเติม signal peptide เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	OD 595 nm (Y)	$X = (Y - 0.1663) / 46.638^*$	ความเข้มข้น ของโปรตีน (μg/μl)**	หมายเหตุ
pET28α-pelB-Sly	0.723	0.012	0.119	เจือจาง 10 เท่า
pET28α-Sly	0.673	0.011	0.109	เจือจาง 10 เท่า
pET28α	0.485	0.007	0.068***	เจือจาง 10 เท่า

* ความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

* ความเข้มข้นที่แท้จริงของโปรตีน = X * ความเจือจาง

*** ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำที่สุดในชุดการทดลองนี้ โดยใช้ 30 μl/lane = 2.04 μg



ภาพ 23 ศึกษาผลของการเติม signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly

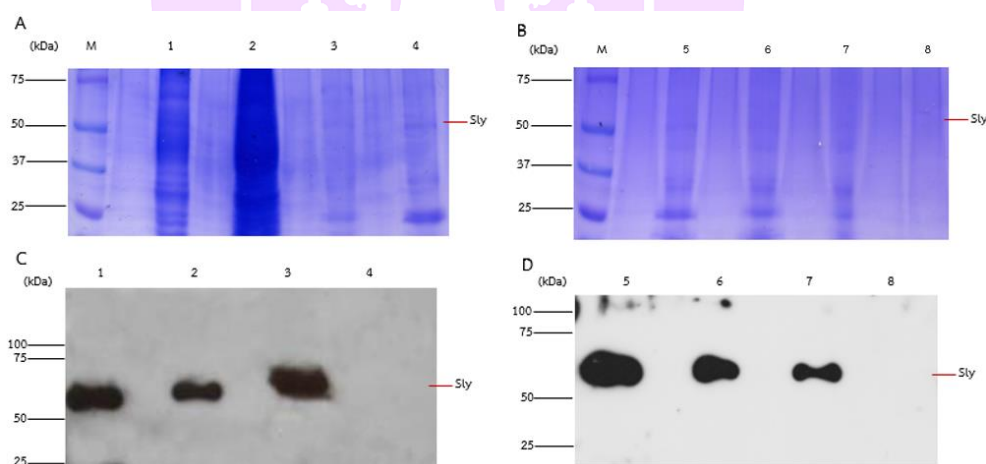
ของ pET28a-pelB-Sly และ pET28a-Sly ที่อยู่ใน *E. coli* BL21 (DE3) โปรตีนที่ละลายน้ำได้ (2.04 μ g) ของ *E. coli* lysates ที่เหนี่ยวนำด้วย 0.5 mM IPTG บ่มที่ 28 °C เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบด้วย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue Stain solution (A) และ Western blot analysis ด้วย anti-Histidine tag antibody (B); 1, 2 และ 3 : ตัวอย่างของ *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-pelB-Sly, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-Sly และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a (control vector) ตามลำดับ, N : *E. coli* BL21(DE3) (host cell negative control), M : Precision plus protein dual color standards, ลูกศร : Sly ขนาด 54 kDa และ * : non specific โปรตีน ขนาด 43 kDa

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีน Sly ที่ผลิตได้จาก *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-Sly นำโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 500 ml จำนวน 5 ขวด รวมเป็น 2,500 ml เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 0.5 mM IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ จำนวน 5 ml และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 30 kDa MWCO เหลือ 1 ml จากนั้นนำโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้แบบเข้มข้น 1 ml ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HisTrap™ FF Column ผลการศึกษพบว่า โปรตีน Sly ขนาด 54 kDa สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้เมื่อชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 80, 100 และ 200 mM Imidazole Elution buffer อย่างไรก็ตาม พบว่ามีโปรตีน Sly หลุดลอดออกมาจากคอลัมน์ โดยพบใน Unbound และ Wash fraction (ภาพที่ 24) โดยใน wash fraction มีโปรตีนที่ Sly รั่วหรือหลุดลอดออกมาเป็นปริมาณมาก (ภาพที่ 22 เสน 3 และตารางที่ 9) เมื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีน Sly ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำปริมาณโปรตีนของ 80, 100 และ 200 mM Imidazole Elution fraction มารวมกัน มีค่าเท่ากับ 1.495 mg ซึ่งโปรตีน Sly ที่บริสุทธิ์นี้ได้มาจากการเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 2.5 l ดังนั้นความสามารถในการผลิตโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้โดยระบบการแสดงออกของ *E. coli* โดยใช้ *E. coli* BL21 (DE3) ในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าเท่ากับ 0.60 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่คาดหวังไว้

ตาราง 16 การคำนวณหาปริมาณโปรตีน Sly ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

Samples	Volume before concentrate (ml)	Volume after concentrate (ml)	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Total protein (mg)
Crude sample	1		350.70	350.7
Unbound protein	5	0.5	115.30	57.65
Wash fraction	15	1	267.20	267.2
Elution fraction 50 mM Imidazole	5	0.5	1.53	0.765
Elution fraction 80 mM Imidazole	5	0.5	2.20	1.10
Elution fraction 100 mM Imidazole	5	0.5	0.45	0.225
Elution fraction 200 mM Imidazole	5	0.5	0.34	0.17
Elution fraction 300 mM Imidazole	5	0.5	0.08	0.04



ภาพ 24 การแยกโปรตีน Sly ให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ FF Column 12.5% SDS-PAGE

(A และ B) และ Western blot analysis

ด้วย anti-Histidine tag antibody (C และ D) นำโปรตีน Sly ที่ละลายน้ำได้ และทำให้เข้มข้นมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ FF Column; 1 : crude sample, 2 : unbound protein, 3 : wash fraction, 4-8 : elution fraction ด้วย imidazole elution fractions ความเข้มข้น 50, 80, 100, 200 และ 300, M : Precision plus protein dual color standards และลูกศร : Sly ขนาด 54 kDa

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้ เริ่มต้นโดยการนำยีน *Suilysin* จาก *S. suis* serotype 2 ขนาด 1,491 bp ที่มีการปรับเปลี่ยน codon usage ให้เหมาะสมกับระบบการแสดงออกใน *E. coli* และโคลนอยู่ใน pET28a expression vector และถ่ายฝากไปยัง *E. coli* BL21 (DE3) โดยมีโครงสร้างของยีน 2 แบบ คือ มีและไม่มี pelB signal peptide pET28a-pelB-Sly และ pET28a-Sly ตามลำดับ มาตรวจสอบความถูกต้องโดยการสกัด plasmid DNA และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปลายทั้งสองด้านของยีน ตรวจสอบขนาดของยีนด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการตรวจสอบยืนยันว่าขนาดของดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง จึงนำมาดำเนินการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ช่วยส่งเสริมการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ โดยในช่วงต้นของการศึกษา ได้นำ pET28a-Sly ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่มี pelB signal peptide มาใช้ในการศึกษาเพื่อลดปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องออก เริ่มต้นโดยศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly ในระบบการแสดงออกของ *E. coli* เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของกลูโคสต่อการผลิตโปรตีน Sly โดยแบ่งออกเป็นสองชุดทดลอง ได้แก่ ชุดที่เติมกลูโคสและชุดที่ไม่เติมกลูโคส หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ได้ทำการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำจากตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา ตรวจสอบคุณภาพและขนาดของโปรตีนโดย 12.5% SDS-PAGE และ Western blot analysis ผลการศึกษพบว่ามีการแสดงออกของ Histidine tag-Sly พิวซ์โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 54 kDa ในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมกลูโคสตั้งแต่ 2 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ ขณะที่ในตัวอย่างที่เติมกลูโคส 0.8% พบการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายที่ 4 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ และมีปริมาณสูงสุดที่ 6 ชั่วโมงในทั้งสองชุดการทดลอง สอดคล้องกับงานของ Atroschenko, et al., (2024) กล่าวถึงการเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อัตราการแสดงออกของการผลิตโปรตีนสายผสมลดลง เนื่องจากกลูโคสมีผลไปยัง catabolite ซึ่งการเติมกลูโคส 1% ทำให้ความสามารถในการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้การลดอัตราการผลิตโปรตีนอาจนำไปสู่ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีนในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ โดยเทคนิคนี้มักนำไปปรับใช้ในการแสดงออกของโปรตีนที่มีความเป็นพิษสูงหรือความเป็นพิษจะถูกแสดงออกในปริมาณเล็กน้อยที่อาจนำไปสู่การตายของเซลล์ก่อนที่จะ

ถึงความหนาแน่นของเซลล์ที่ต้องการต่อการผลิตโปรตีนได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) และ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly ทั้งในสภาวะที่เติมและไม่เติมกลูโคส พบว่าสูตรอาหารที่มีการเติมกลูโคสสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตในช่วง 3 ชั่วโมงแรกได้ดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมกลูโคส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kopp, et al., (2017) กล่าวถึงการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่ใช้ง่ายและให้พลังงานจำนวนมากแก่เซลล์ ทำให้การเจริญเติบโตเร็วและมีการสร้าง ATP ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อมีการใช้กลูโคสร่วมกับแล็กโทสอาจส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตแบบ diauxic ซึ่งจะใช้เวลาแหล่งคาร์บอนแรกที่ใช้ยาก่อนจนหมดจึงจะเริ่มการใช้แหล่งคาร์บอนที่สองที่เหลืออยู่ในอาหาร เช่น แล็กโทส ซึ่งการมีกลูโคสในอาหารที่มากเกินไปจะส่งผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์และชะลอการผลิตโปรตีนได้ ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของ IPTG ต่อการผลิตโปรตีน Sly ที่มีการแบ่งชุดทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-sly ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมกลูโคสและไม่เติมกลูโคส และมีการเติม IPTG ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 mM ผลการทดลองพบว่าการผลิตโปรตีน Sly ในทุกระดับความเข้มข้นของ IPTG คือ 0, 0.5 และ 1 mM ในตัวอย่างที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่เติมกลูโคสเท่านั้น ส่วนตัวอย่างที่มีการเติมกลูโคสไม่มีการผลิตโปรตีน Sly การที่พบการผลิตโปรตีนในสูตรอาหารที่ไม่เติมสารเหนี่ยวนำ พบได้ในการผลิตโปรตีนใน *E. coli* (DE3) ที่มีการผลิตโปรตีนได้ถึงแม้จะไม่มีการเติมสารเหนี่ยวนำ (leaky expression) (Gheibihayat, et al., 2018) ซึ่งเป็นสถานการณ์ที่เกิดขึ้นได้ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนในระดับต่ำ แม้ไม่มีการเติมสารกระตุ้น (IPTG) (Chaudhary & Lee, 2015)

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำโปรตีนพบว่าการผลิตโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 15 ซึ่งในชั่วโมงที่ 12 ให้ผลดีที่สุด ส่วนในชั่วโมงที่ 18 - 24 ไม่สามารถแสดงผล Western blot analysis ได้ จึงพิจารณาจากปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบด้วยวิธี Bradford method ซึ่งพบว่าการผลิตโปรตีนลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 - 24 ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาที่ 12 ชั่วโมงในการทำการทดลองต่อไป

ในการทดลองอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำ พบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดคือ 28 °C ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pouresmaeil และ Azizi-Dargahlou, (2023) ที่รายงานถึงการใช้อุณหภูมิต่ำสามารถลดการเกิด Inclusion Bodies (IBs) และช่วยให้โปรตีนสายผสมพับตัวได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นกลไกที่สามารถลดภาระทางเมแทบอลิซึมของเซลล์ *E. coli* ที่ใช้เป็นโฮสต์ในการผลิตโปรตีนสายผสม ส่งผลให้โปรตีนที่ได้มีโครงสร้างที่เหมาะสมมากขึ้น โดยที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดในการผลิตโปรตีนคือ 28.5 °C (Pouresmaeil, et al.,

2023) และรายงานของ Saejung, et al., (2006) ซึ่งมีการผลิตโปรตีน Recombinant Soluble Dengue Virus 2 Envelope Domain III ได้สูงที่สุดเมื่อมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ 28 °C ในส่วนของการศึกษาผลของ pelB signal peptide ต่อการผลิตโปรตีน Sly พบว่าในตัวอย่างที่ไม่มี pelB signal peptide ผลิตโปรตีน Sly ได้ดีกว่าในตัวอย่างที่มี pelB signal peptide เมื่อทำการตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตภายในเซลล์ จากรายงานของ Singh, et al., (2013) การศึกษาการหลั่งของโปรตีนใน *E. coli* พบว่า recombinant proinsulin เพิ่มขึ้น 10 เท่า เมื่อโปรตีนถูกหลั่งใน periplasmic ส่วนรายงานของ Heinz, (2006) กล่าวถึงการเติม 5 aspartate repeat sequence (5D) ต่อท้าย pelB เพื่อทดสอบฟังก์ชันของ pelB-5D ใน vector สำหรับการแสดงออกโปรตีน พบว่า pelB-5D ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ได้ดี ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ตรงข้ามกับรายงานของ Singh, et al., (2013) และ Heinz, (2006) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตภายในเซลล์ ไม่ได้ตรวจสอบโปรตีนที่มีการหลั่งออกนอกเซลล์เพื่อศึกษาผลของ pelB signal peptide ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าการเพิ่ม pelB signal peptide เข้าในไปโครงสร้างของยีน Sly มีส่วนช่วยให้การผลิตโปรตีน Sly ดีขึ้นหรือไม่

ในส่วนสุดท้ายของการศึกษา ทำการผลิตโปรตีนลูกผสม Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ที่ผลิตจาก *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-Sly โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ เหนี่ยวนำด้วย 0.5 mM IPTG บ่มที่ 28 °C 12 ชั่วโมง และนำโปรตีนที่ผลิตได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ FF Column พบว่าระบบการแสดงออกของ *E. coli* ที่ใช้ สามารถผลิตโปรตีนลูกผสม Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ และแยกให้บริสุทธิ์ได้เท่ากับ 0.60 mg/L ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าที่คาดการณ์ไว้ โดยเมื่อเทียบกับรายงานของ Saejung, et al., (2006) ที่ผลิตโปรตีน Recombinant Soluble Dengue Virus 2 Envelope Domain III ใน *E. coli* สายพันธุ์กลายพันธุ์คู่ trxB และ gor, Origami ซึ่งพบว่าสามารถผลิตโปรตีนและแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้เท่ากับ 1.6 mg/L ซึ่งสูงกว่าในการศึกษาครั้งนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น เนื่องมาจากการโหลดโปรตีนลงในคอลัมน์ที่มากเกินไปเกินความสามารถของ resin จึงทำให้โปรตีนส่วนเกินถูกชะออกมาอย่างรวดเร็วและปริมาณมากในส่วนของ Unbound protein และ Wash fraction อย่างไรก็ตามหากคำนึงถึงเพียงในส่วนของการผลิตได้ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ระบบการแสดงออกที่เลือกใช้นี้สามารถผลิตโปรตีนได้มากถึง 350 mg ต่ออาหาร 2.5 l หรือเท่ากับ 140 mg/l

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ระบบการแสดงออก *E. coli* ที่ใช้สามารถผลิตโปรตีนสายผสม Sly ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้อย่างเหมาะสม และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นได้โดยการใช้สัดส่วนที่เหมาะสม นอกจากนี้โปรตีนที่ผลิตได้ควรนำไปศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน Sly เพิ่มเติม เช่น ศึกษาความสามารถในการทำให้เลือดแตกตัว (Hemolytic activity) จากนั้นสามารถนำ Sly ไปต่อยอดสำหรับพัฒนาเป็นวัคซีนหรือสารเสริมฤทธิ์วัคซีนต่อเชื้อ *S. suis* ได้ในอนาคต



บรรณานุกรม

- กรมระบาดวิทยา. (มปป). การระบาดโรคไขุ่หัดับ. ข้อมูลจาก
<https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1530420240205033832.pdf>.
สืบค้นวันที่ 19/11/2567.
- Academic Wording. (n.d.) In language and learning online. Retrieved from
https://www.gibthai.com/service/note_detail/16
- Academic Wording. (n.d.). vector. Retrieved from
[https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:pET-28a-c\(%2B\).JPG](https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:pET-28a-c(%2B).JPG)
- Academic Wording. (n.d.). *Streptococcus suis*. Retrieved from
<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis>
- Atroshenko, D .L., Sergeev, E.P., Golovina, D. I. and Pometun, A. A. (2024). Additivities for Soluble Recombinant Protein Expression in Cytoplasm of *Escherichia coli*.
Trop. Med. Infect, 10, 120.
- Benga, L., Fulde, M., Neis, C., Goethe, R. and Valentin-Weigand, P. (2008). Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. **Veterinary Microbiology**, 132(1–2), 211–219.
- Biswas, K., Pandey, P., Kumar, R. and Maurya, M. (2016). Microbial recombinant protein: An epic from fundamental to future panorama of life science. **Research Trends in Molecular Biology**, 1–34.
- by omitting the inducer IPTG. **Microbial Cell Factories**, 14(1).
- Carmignotto, G. P. and Azzoni, A. R. (2019). On the expression of recombinant Cas9 protein in *E. coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta strains. **Journal of Biotechnology**.

- Chaudhary, A. K. and Lee, E. Y. (2015). Tightly regulated and high-level expression vector construction for *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 31, 367–373.
- Chung, B. H., Sohn, M.-J., Oh, S.-W., Park, U.-S., Poo, H., Kim, B. S. ... and Lee, Y. I. (1998). Overproduction of human granulocyte-colony stimulating factor fused to the pelB signal peptide in *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 85(4), 443–446.
- Ermolaeva, M. D. (2001). Synonymous Codon Usage in Bacteria. **Curr. Issues Mol. Biol**, 3(4), 91–37.
- Fan, H. (2017). Advances in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. **Journal of Integrative Agriculture**, 16(12), 2834–2847.
- Gheibi Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B. and Sahebkar, A. H. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. **Current Pharmaceutical Design**.
- Gheibihayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B. and Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): What We Need to Know. **Current Pharmaceutical Design**.
- Gomez, E., Kennedy, C. C., Gottschalk, M., Cunningham, S. A., Patel, R. and Virk, A. (2014). *Streptococcus suis*-Related Prosthetic Joint Infection and Streptococcal Toxic Shock-Like Syndrome in a Pig Farmer in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, 52(6), 2254–2258.
- Gottschalk, M. (2024). *Streptococcus suis* Infection in Pigs. Retrieved from <https://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/streptococcal-infections-in-pigs/streptococcus-suis-infection-in-pigs>
- Gottschalk, M., Turgeon, P., Higgins, R., Beaudoin, M. and Bourgault, A. M. (1991). Susceptibility of *Streptococcus suis* to Penicillin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 3(2), 170–172.
- Goyette-Desjardins, G., Auger, J. P., Xu, J., Segura, M. and Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent an

update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing.

Emerging Microbes & Infections, 3(6), e45–e45.

Hannig, G., & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, 16(2), 54–60.

He, Z., Pian, Y., Ren, Z., Bi, L., Yuan, Y., Zheng, Y., ... & Wang, F. (2014). Increased production of suilysin contributes to invasive infection of the *Streptococcus suis* strain 05ZYH33. **Molecular Medicine Reports**, 10(6), 2819–2826.

Heinz, A. (2006). PelB leader sequence; directs protein to *E. coli* periplasmic membrane. Retrieved from https://parts.igem.org/Part:BBa_J32015.

Heyde, S. A. H. and Nørholm, M. H. H. (2021). Tailoring the evolution of BL21(DE3) uncovers a key role for RNA stability in gene expression toxicity. **Communications Biology**, 4(1).

Ho, J. M. L., Miller, C. A., Parks, S. E., Mattia, J. R. and Bennett and M. R. (2021). A suppressor tRNA-mediated feedforward loop eliminates leaky gene expression in bacteria. **Nucleic Acids Research**. 49(5)

Jacobs, A. A., Loeffen, P. L., van den Berg, A. J., & Storm, P. K. (1994). Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. **Infect Immun**, 62(5), 1742–1748.

Kasli, I. M., Thomas, O. R. T., and Overton, T. W. (2019). Use of a design of experiments approach to optimise production of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli*: selection of signal peptide and optimal growth conditions. **AMB Express**, 9(1).

Kerdsin, A. (2022). Human *Streptococcus suis* Infections in Thailand: Epidemiology, Clinical Features, Genotypes, and Susceptibility. **Trop. Med. Infect**, 7, 359

Kopp, J., Slouka, C., Ulonska, S., Kager, J., Fricke, J., Spadiut, O. and Herwig, C. (2018). Impact of Glycerol as Carbon Source onto Specific Sugar and Inducer Uptake Rates and Inclusion Body Productivity in *E. coli* BL21 (DE3). **Trop. Med. Infect**, 5, 1

Lawrence, J. G. and Ochman, H. (1998). Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. **Biological Sciences**, 95(16), 9413–9417.

- Leung, L., Dudkina, N. V., Lukyanova, N., Hodel, A. W., Farabella, I., Pandurangan, A. P. and Hoogenboom, B. W. (2014). Stepwise visualization of membrane pore formation by suliyisin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin. **eLife**, 3, e04247
- Li, S., Wang, D., Guo, C., Tian, M., Liu, Q. and Pan, Z. (2021). Study on preparation of a *Streptococcus suis* ghost vaccine. **Microbial Pathogenesis**, 154, 104865.
- Lun, Z. R., Wang, Q. P., Chen, X. G., Li, A. X. and Zhu, X. Q. (2007). *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, 7(3), 201–209.
- Modified form: Brooker, R. J. (2018). Genetics: analysis & principles. New York: **Mc Graw–Hill Education**. (pp. 336–516).
- Mohamed Ali Hanapiah, R., Abu Samah, R., Atikah Mohd Rodzri, N., Ahmad Khushairi Mohd Zahari, M. and Salwanis Wan Md. Zain, W. (2019). Effects of Culture Conditions on Growth and Production of Xylonic Acid using Recombinant *E. coli* BL21 (DE3). **Materials Today: Proceedings**, 19, 1467–1472.
- Molner, C. and Gari, J. (Eds). (2015). Concepts of Biology – 1st Canadian Edition. Ontario OER Collection. **BCcampus**. pp: 335–362. Retrieved from <https://opentextbc.ca/biology/>
- Parisien, A., Al-Zarka, F., Hussack, G., Baranova, E. A., Thibault, J. and Lan, C. Q. (2012). Nickel nanoparticles synthesized by a modified polyol method for the purification of histidine-tagged single-domain antibody ToxA5.1. **Journal of Materials Research**, 27(22), 2884–2890.
- Paul, H. (2014). Monitoring Bacterial Growth under Different Environmental Conditions. **Application Note Microbiology**. Retrieved from https://www.agilent.com/cs/library/applications/monitoring-bacterial-growth-5994-2549EN-agilent.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Pinske C, Bönn M, Krüger S, Lindenstrauß U, and Sawers R G. (2011). Metabolic Deficiencies Revealed in the Biotechnologically Important Model Bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). **Plos one**, 6(8).
- Pouresmaeil, M. & Azizi-Dargahlou, S. (2023). Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. **Archives of Microbiology**, 205:212.

- Saejung, W., Puttikhunt, C., Prommool, T., Sojikul, P., Tanaka, R., Fujiyama, K., Malasit P. and Seki, T. (2006). Enhancement of recombinant soluble dengue virus 2 envelope domain III protein production in *Escherichia coli* trxB and gor double mutant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 102(4), 333–339.
- Saïda, F. (2007). Overview on the Expression of Toxic Gene Products in *Escherichia coli*. **Current Protocols in Protein Science**, 50(1), 5.19.1–5.19.13.
- Schein, C. H. (1989). Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. **Nature Biotechnology**, 7(11), 1141–1149.
- Segura, M. (2015). *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. **Expert Review of Vaccines**, 14(12), 1587–1608.
- Shi, L., Liu, H., Gao, S., Weng, Y. and Zhu, L. (2021). Enhanced Extracellular Production of IsPETase in *Escherichia coli* via Engineering of the pelB Signal Peptide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 69(7), 2245–2252.
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z. and Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. **Communications Biology**, 3(1).
- Singh, P., Sharma, L., Kulothungan, S. R., Adkar, B. V., Prajapati, R. S., Ali, P. S. S. ... and Varadarajan, R. (2013). Effect of Signal Peptide on Stability and Folding of *Escherichia coli* Thioredoxin. **PLoS ONE**, 8(5), e63442.
- Singh, P., Sharma, L., Kulothungan, S. R., Adker, B. V., Prajapati, R. S., Ali, P. S. S., Krishnan, B. and Varadarajan, R. (2013). Effect of Signal Peptide on Stability and Folding of *Escherichia coli* Thioredoxin. **PLoS ONE**, 8(5).
- Singpolatn, N. (2019). Prevalence and Susceptibility Pattern of *Streptococcus suis* at Maharat Nakhon Ratchasima Hospital. **J Med Tech Assoc Thailand**, 47.
- Sokolosky, J. T. and Szoka, F. C. (2013). Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. **Protein Expression and Purification**, 87(2), 129–135.
- Soltani, C. E., Hotze, E. M., Johnson, A. E. and Tweten, R. K. (2007). Specific Protein–Membrane Contacts Are Required for Prepore and Pore Assembly by a

- Cholesterol-dependent Cytolysin. **Journal of Biological Chemistry**, 282(21), 15709–15716.
- Suriya, B., Cheunsombut, P., Muneekaew, P., Sanghong, S. and Phiwpan, K. (2019). Development of a Screening Test for Detection of *Streptococcus suis* Serotype 2. **J Med Tech Assoc Thailand**, 47.
- Takeuchi, D., Akeda, Y., Nakayama, T., Kerdsin, A., Sano, Y., Kanda, T. ... and Oishi, K. (2013). The Contribution of Suilysin to the Pathogenesis of *Streptococcus suis* Meningitis. **The Journal of Infectious Diseases**, 209(10), 1509–1519.
- Tenenbaum, T., Asmat, T. M., Seitz, M., Schroten, H. and Schwerk, C. (2016). Biological activities of suilysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis. **Future Microbiology**, 11(7), 941–954.
- Watthanadirek, A., Doungdaolek, T., Koedrith, P. and Anuracpreeda, P. (2018). Expression of recombinant major surface protein 5 of *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) at different temperatures. **Chulalongkorn Medical Journal**, 26(3).
- Wu, M. C., Doan, T. D., Lee, J. W., Lo, Y. T., Wu, H. C. and Chu, C. Y. (2022). Recombinant suilysin of *Streptococcus suis* enhances the protective efficacy of an engineered *Pasteurella multocida* toxin protein. **Res Vet Sci**, 151, 175–183.
- Xu, L., Huang, B., Du, H., Zhang, X. C., Xu, J., Li, X. and Rao, Z. (2010). Crystal structure of cytotoxin protein suilysin from *Streptococcus suis*. **Protein & Cell**, 1(1), 96–105.
- Zhang, Z., Kuipers, G., Niemiec, Ł., Baumgarten, T., Slotboom, D. J., de Gier, J.-W. and Hjelm, A. (2015). High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. **Microbial Cell Factories**, 14(1).
- Zhang, Z., Kuipers, G., Niemiec, Ł., Baumgarten, T., Slotboom, D. J., de Gier, J. W. and Hjelm, A. (2015). High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3)
- Zheng, P., Zhao, Y. X., Zhang, A. D., Kang, C., Chen, H. C. and Jin, M. L. (2009). Pathologic Analysis of the Brain from *Streptococcus suis* Type 2 Experimentally Infected Pigs. **Veterinary Pathology**, 46(3), 531–535..

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. 2x yeast extract tryptone (2xYT)

Tryptone 16 g

Yeast extract 10 g

Sodium chloride 5 g

Agar 15 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว

2. Bertani broth (LB)

Tryptone 10 g

Yeast extract 5 g

Sodium chloride 5 g

Agar 15 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว



ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี

1. 50x Tris–acetic buffer (TAE)

Tris–base 240 g

Glacial acetic acid 57.1 ml

0.5 M EDTA 100 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อนิ้วตารางนิ้ว

การเตรียม 1x TAE : 50x TAE 20 ml ผสมกับน้ำ 980 ml

2. 1M Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

IPTG 4.76 g

น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 20 ml

กรองสารละลายด้วย syringe filter ขนาด 0.45 μ m เก็บในตู้ -20 °C

3. 30% Acrylamide

Acrylamide 29 g

Bis–Acrylamide 1 g

เติมน้ำ 100 ml และเก็บไว้ในภาชนะทึบแสงและ เก็บในตู้ 4 °C

4. 1.5 M Tris–Base (pH 8.8)

Tris 18.17 g

เติมน้ำ 50 ml ผสมจนสารละลายเข้ากันดี ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 8.8 ± 0.2 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อนิ้วตารางนิ้ว

5. 1 M Tris–Base (pH 6.8)

Tris 12.11 g

เติมน้ำ 50 ml ผสมจนสารละลายเข้ากันดี ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 ± 0.2 จากนั้น
ปรับปริมาตรเป็น 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ตตารางนิ้ว

6. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

SDS 10 g

เติมน้ำ 100 ml เก็บไว้ในตู้ 4°C

7. 10% Ammonium persulfate (APS)

APS 10 g

เติมน้ำ 100 ml เก็บไว้ในตู้ 4°C

8. Protein running buffer

Glycine 14.4 g

Tris 3 g

SDS 1 g

เติมน้ำ 1,000 ml

9. Protein sample loading buffer 5x

1 M Tris–Base (pH 6.8) 31.25 ml

SDS 10 g

Glycine 25 ml

Bromophenol Blue (2% ใน ethanal) 750 μl

2–mercaptoethanol 5 μl

เติมน้ำ 100 ml

10. Transfer buffer

Methanol 15 ml

Protein running buffer 85 ml

11. 10x PBS buffer (pH7.4)

Sodium chloride 80 g

Potassium chloride 2 g

di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate 14.4 g

Potassium Dihydrogen Phosphate 2.4 g

เติมน้ำ 800 ml ผสมจนสารละลายเข้ากันดี ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 ± 0.2 จากนั้น
 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ตารางนิ้ว

การเตรียม PBS buffer: 10x PBS buffer 100 ml ผสมกับน้ำ 900 ml

12. 5% Skim milk หรือ 1% Skim milk

ชั่ง Skim milk 1 g (สำหรับ 1%) และ 5g (สำหรับ 5%) ละลายใน PBS buffer (pH7.4)
 100 ml เก็บในตู้ 4°C (ใช้ครั้งเดียว)

13. Wash buffer for Western blot analysis

PBS buffer (pH7.4) 100 ml

Tween 20 1 %

14. Coomassie Brilliant Blue Stain solution

Coomassie Brilliant Blue R-250 2.5 g

Methanol 450 ml

Glacial acetic acid 100 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1,000 ml

15. Destain solution

Methanol 75 ml

Glacial acetic acid 100 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1,000 ml

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	เกษราภรณ์ มีรอด
วัน เดือน ปี เกิด	13 พฤศจิกายน 2540
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลบางบ่อ จ.สมุทรปราการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์ บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยพะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	12/2 ม.4 บ้านหัวค่าย ซอย.1 ต.ในเมือง อ.พิชัย จ.อุตรดิตถ์ รหัสไปรษณีย์ 53120
ผลงานตีพิมพ์	เกษราภรณ์ มีรอด สุภาพร ภัสสร และวนิดา อภิธนาพงศ์. (7 มิถุนายน 2567). ผลของกลูโคสต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซูโลซินที่ละลายน้ำได้ของ <i>Streptococcus suis</i> ใน <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) ในการประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 14 (หน้า 288–296), มหาวิทยาลัยศิลปากร.