

# อภินันทนาการ



สำนักหอสมุด



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ  
การโคลนและการแสดงออกของยีนเอนไซม์  
ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนสในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์

โดย ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
วันลงทะเบียน.....- 2 ส.ย. 2558..
เลขทะเบียน..... 1 6963236 .....
เลขเรียกหนังสือ..... 2 64 .....

450  
0257-1  
2556

21 กรกฎาคม พ.ศ. 2557

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การโคลนและการแสดงออกของยีนเอนไซม์  
ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนสในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์

ผู้วิจัย

ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

โครงการ: การโคลนและการแสดงออกของยีนเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในการกำจัดพิษ  
ฟอร์มาลดีไฮด์

### บทคัดย่อ

เอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส มีความสามารถในการทำลายพิษฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารพิษที่พบ  
ปนเปื้อนได้ในอากาศและน้ำ การศึกษายีนของเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสเริ่มต้นจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน  
อนุรักษ์บางส่วนด้วย degenerate primer นำชิ้นส่วน PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดังกล่าวไปตรวจสอบลำดับเบส  
โดยวิธี sequencing และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วย BLAST search analysis การหาลำดับยีนทั้งเส้นโดยศึกษา  
ด้วยเทคนิค gene walking ตามวิธี one-base excess adaptor ligation ผลการศึกษาลำดับเบส พบว่าประกอบด้วย  
เบสจำนวน 1200 ลำดับเบส ซึ่งแปลรหัสให้สายโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 399 ตัว ซึ่งพบว่ามีความ  
คล้ายคลึงกับยีนเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Pseudomonas putida* ในการศึกษานี้ได้ทำการโคลนยีน  
เอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสลงในเวกเตอร์ pET32a และย้ายเข้าในแบคทีเรีย Origami2 (DE) competent cell  
ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการเพิ่มการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนเอนไซม์  
ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่มากเกินไปในสภาวะเบื้องต้นที่ศึกษา พบว่าโปรตีนที่แสดงออกเกิดการรวมกลุ่มเป็นกลุ่ม  
ก้อนที่ไม่ละลายน้ำ เรียกว่า inclusion bodies ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ดังนั้นจึงปรับสภาวะการ  
กระตุ้นโดยใช้ความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.1 mM และกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2  
ชั่วโมง ทำการแตกเซลล์ในสารละลาย 1 M arginine โดยใช้คลื่นเสียง ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าสารละลาย arginine จะ  
ช่วยยับยั้งการม้วนตัวที่ไม่เหมาะสมของโปรตีน ทำให้โปรตีนที่แสดงออกอยู่ในสภาพที่ละลายได้ดี ผลการทดสอบด้วยวิธี  
western blot analysis ที่ตรวจสอบด้วยแอนติบอดีต่อ histidine สามารถยืนยันขนาดของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นการ  
แสดงออกขนาด 65 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่สนใจ เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่า  
เอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นให้แสดงออกเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถละลายได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในขั้นตอนต่อไปควร  
จะทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ศึกษา เพื่อจะได้นำเอนไซม์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้  
ในการทำลายพิษฟอร์มาลดีไฮด์ต่อไป

**Title: Cloning and expression of formaldehyde dehydrogenase gene for formaldehyde detoxification**

### ABSTRACT

Formaldehyde dehydrogenase (FDH) involves in the detoxification of formaldehyde which is the toxic compound present in air and water. Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The PCR product of partial DNA fragment was confirmed to FDH gene by sequencing and BLAST search analysis. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique. The coding sequence consisted of 1200 bp encoding a polypeptide of 399 amino acid and shows high sequence identity with *Pseudomonas putida* FDH gene. The full length cDNA of FDH gene was cloned into pET32a expression vector and transformed to Origami2 (DE) competent cell which greatly enhance disulfide bond formation in the *E.Coli* cytoplasm. The recombinant protein expression of FDH gene isolated from formaldehyde enriched wastewater bacteria was determined in this study. The overproduction of recombinant FDH protein caused the formation of insoluble aggregate inclusion bodies. To improve the solubility of FDH protein, the optimum of 0.1 mM IPTG was used to induce the protein expression at 28 °C for 2 hours. The recombinant proteins from sonicated cell were sonicated with 1 M arginine solution which supposed to be the suppressor of folding recombinant protein aggregation. Western blot analysis was performed to confirm the 65 kDa recombinant FDH protein using anti-His antibodies. The purified FDH enzyme indicated the potential of solubilized FDH recombinant protein expression and enzyme activity. The further characterization of enzyme properties will facilitate the application of FDH enzyme for formaldehyde detoxification.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ไทย)	3
Abstract	4
Executive Summary	6
บทนำ	8
เนื้อหาการวิจัย	12
การดำเนินการวิจัย	13
ผลการดำเนินการวิจัย	19
Output ที่ได้จากการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	40



## Executive Summary

ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำยาบดศพ สารนี้มีความเป็นพิษและเป็นสารกระตุ้นให้เกิดมะเร็งที่ระบบทางเดินหายใจ ต่อมน้ำเหลืองและเม็ดเลือดขาว มีฤทธิ์กัดกร่อนต่อตา ผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจ ในการศึกษาของคณะวิจัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เกี่ยวกับนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์จากการดองร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อการศึกษาทางการแพทย์ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พบว่า มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ให้ลดลงได้อย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ได้โดยเกิดกระบวนการ formaldehyde oxidation โดยเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) มีผลทำให้ฟอร์มาลดีไฮด์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และให้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย จัดเป็นกระบวนการลดพิษ (Detoxification) ซึ่งจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและดำรงชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ในปริมาณสูงได้

ในการศึกษากลไกการทำลายพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ จำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจถึงการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายดังกล่าว การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการโคลนยีนและหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) และศึกษาการแสดงออกเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในภาวะแวดล้อมที่มีระดับฟอร์มาลดีไฮด์สูง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่ทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ผลการศึกษาการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พบแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ คือ ไอโซเลทหมายเลข 1 และหมายเลข 4 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะโคลิ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตลอดจนการย้อมสีแกรม เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียเบื้องต้นสามารถจัดจำแนกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มของจีนัส *Pseudomonas sp.* การศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ เริ่มต้นโดยใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนในบริเวณที่สนใจด้วย degenerate primer พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าเป็นลำดับเบสที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase ทำการหา full-length of FDH cDNA โดยวิธี one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique และ เทคนิค Whole Genome PCR จากนั้นโคลนชิ้นส่วน full-length cDNA ของ FDH และหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าลำดับเบสของยีน FDH จากเชื้อไอโซเลทหมายเลข 1 และหมายเลข 4 มีความคล้ายคลึงกับ FDH gene ของ *Pseudomonas putida HB3267* คิดเป็น 98% และ 93% ตามลำดับ การศึกษาการแสดงออกระดับโปรตีนของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเชื้อไอโซเลทหมายเลข 1 และหมายเลข 4 ทำโดยการโคลนยีน FDH จากเชื้อแต่ละไอโซเลทเข้าใน pET32a expression vector และ transform ใน Origami competent cell ทำการเลี้ยง

เชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C และกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 65 KDa ซึ่งเป็นขนาดโปรตีน FDH 42 KDa รวมกับขนาดโปรตีนบางส่วนจาก expression pET32a vector สามารถตรวจสอบยืนยันว่าเป็นโปรตีน FDH ด้วยวิธี western blot analysis โปรตีนมีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามโปรตีนที่แสดงออกรวมตัวอยู่ภายในเซลล์ในรูปของ inclusion bodies เนื่องจาก recombinant protein อยู่ในรูปที่เป็น inclusion bodies จึงมีผลต่อกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA affinity column ดังนั้นจึงต้องทำให้โปรตีนละลายในสภาวะ denaturing condition การทำให้โปรตีนละลายโดยใช้ denaturing buffer ที่มี 8 M urea เป็นองค์ประกอบ มีผลทำให้โปรตีนละลายได้ แต่ผลเสียคือโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และการทำให้กลับสู่สภาพเดิม (refolding) ด้วยวิธีการเติมสารละลาย additive ชนิดต่างๆ ยังไม่สามารถทำให้โปรตีนกลับมาสู่สภาพเดิมได้ จึงยังตรวจไม่พบ FDH activity ได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทดสอบหาสารละลายที่ไม่มีคุณสมบัติเป็น denaturing agent เพื่อทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการละลายได้ พบว่าโปรตีนที่ถูกกระตุ้นให้แสดงออกสามารถละลายในสารละลาย Arginine นอกจากนี้การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิที่ต่ำลง คือที่อุณหภูมิ 28 °C ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตช้าลง ส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนช้าลง ทำให้มีปริมาณโปรตีนที่ไม่มากเกินไปที่จะมารวมตัวกันเป็น inclusion bodies ซึ่งอาจทำให้เกิดปริมาณ inclusion bodies ลดลงและทำให้โปรตีนละลายออกมาในส่วน soluble fraction ได้ดีขึ้น ทำการ purify FDH enzyme โดยการแยกแถบโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี native gel electrophoresis เพื่อคงสภาพให้โปรตีนอยู่ในสภาพธรรมชาติ และทำการตัดแถบโปรตีนที่สนใจมาละลายใน buffer และตรวจสอบ FDH activity ผลการทดสอบ FDH activity พบว่าสามารถตรวจสอบ FDH activity ได้ โดยเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มีค่า specific activity ต่ำกว่า crude enzyme อาจจะเป็นเนื่องมาจากการสูญเสีย yield ของโปรตีนบางส่วนในขณะที่ทำการตัดแถบโปรตีนในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โปรตีน ความรู้ในระดับบัณฑิตศึกษาการแสดงออกระดับยีนและโปรตีนของเอนไซม์ FDH การกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ FDH กลไกและการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ เป็นความรู้พื้นฐานที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสารพิษฟอรัมาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ

## บทนำ

Formaldehyde หรือ Formalin เป็นสารที่ใช้สำหรับดองศพเพื่อไม่ให้ศพเน่าเปื่อย ใช้ฆ่าเชื้อโรค ฆ่าเชื้อรา formalin จะมีพิษต่อระบบทางเดินหายใจ หากได้รับในรูปของไอระเหยของ formaldehyde แม้จะปริมาณต่ำ ๆ ถ้าถูกตาจะระคายเคืองตามาก ถ้าสูดดมเข้าไปจะทำให้หลอดลมบวม ทำให้แสบจมูก เจ็บคอ ไอ หายใจไม่ออก ปอดอักเสบ น้ำท่วมปอด ทำให้เป็นแผลหรือถึงขั้นตาบอด ถ้าสูดดมเข้าไปมาก ๆ จะทำให้น้ำท่วมปอด จนหายใจไม่ออก แน่นหน้าอก และเมื่อสัมผัสจะเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ทำให้เกิดผื่นคัน เป็นผื่นแดงเหมือนลมพิษ จนถึงผิวหนังไหม้ เปลี่ยนเป็นสีขาวได้หากสัมผัสโดยตรง ในการเรียนการสอนชั้นปรีคลินิกของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้รับผิดชอบจัดการเรียนการสอนวิชากายวิภาคศาสตร์ สำหรับนิสิตวิทยาศาสตร์สุขภาพทุกสาขา ซึ่งจำเป็นต้องมีการเตรียมร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อใช้ในการเรียนการสอนดังกล่าว โดยมีหน่วยรับบริจาคร่างกายสำหรับผู้ประสงค์จะอุทิศร่างกายเพื่อใช้ในการศึกษาหลังจากเสียชีวิตแล้ว และอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับดองร่างผู้เสียชีวิตให้มีสภาพที่สมบูรณ์ที่สุดก่อนนำไปศึกษา ในการดองร่างอาจารย์ใหญ่มีอัตราการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในปริมาณที่มาก และมีความเข้มข้นสูง และเมื่อศึกษาถึงส่วนประกอบของน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่ที่ใช้ในการดองแต่ละครั้งพบว่ามีการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นสูง โดยมีอัตราส่วนของฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 40 % ในการศึกษาของคณะวิจัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เกี่ยวกับนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์จากการดองร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อการศึกษาทางการแพทย์ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จำนวนสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยใช้อาหาร formaldehyde enrichment medium ที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ และจากการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละสายพันธุ์พบว่า มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ให้ลดลงได้อย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้ง ที่ประกาศโดยกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) กล่าวว่า ปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำทิ้งจะต้องไม่เกิน 1 ppm ดังนั้นจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ เพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดทางชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

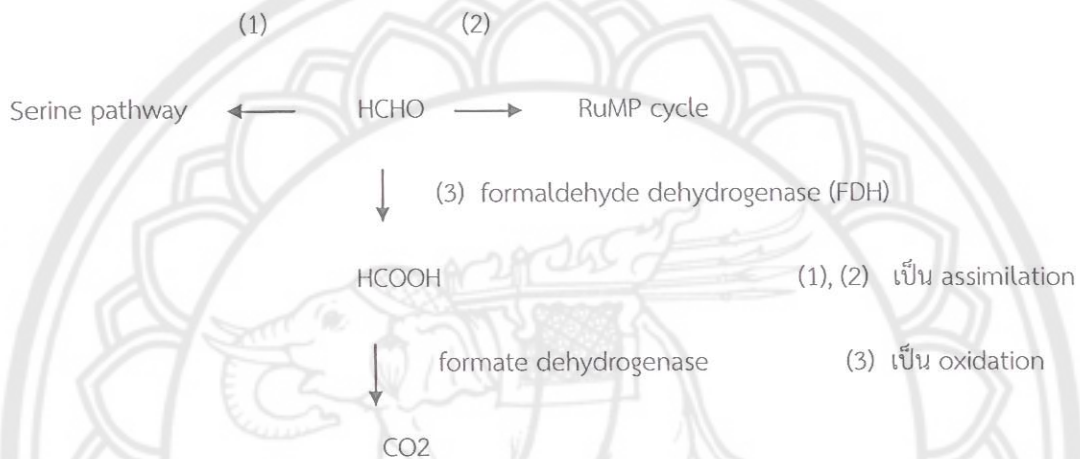
### จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารมลพิษมีความหลากหลายทางชีวภาพ จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษด้วยประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีระบบเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ในวิถีการย่อยสลายสารมลพิษที่ต่างกัน จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวและเหนียวทำให้มีระบบเอนไซม์และวิถีทางชีวภาพที่จำเพาะในการย่อยสลายสารมลพิษเพื่อให้สามารถมีชีวิตรอดได้ในสิ่งแวดล้อม ดังกล่าว ระบบเอนไซม์เหล่านี้เป็นระบบเอนไซม์ที่มีอยู่ในวิถีทางชีวเคมีตามธรรมชาติที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ เพื่อย่อยสลายสารให้ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อให้เซลล์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญได้ รวมถึงการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ด้วย สำหรับจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยสารมลพิษที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารตั้งต้นของเอนไซม์ จุลินทรีย์ต้องมีการปรับตัวของเซลล์ เช่นการกลายพันธุ์เพื่อให้มีความทนทานต่อความเป็นพิษของสารมลพิษนั้น ๆ การเปลี่ยนแปลงอาจเกิดขึ้นจากการเกิดวิวัฒนาการในระดับยีนและโปรตีน ทำให้



เอนไซม์ที่มีอยู่เดิมมีการเปลี่ยนแปลง และมีความสามารถทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีมลพิษนั้น ๆ ได้

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์จัดอยู่ในกลุ่ม methylotroph ซึ่งหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ยกตัวอย่างสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม เช่น methane, methanol, methylamine, formate และ formaldehyde จากการรายงานการศึกษาของ Mitsui และคณะ (Mitsui et al, 2004) แบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ได้นั้นเซลล์ของแบคทีเรียต้องมีระบบ formaldehyde fixation ตามด้วยการ oxidation และ assimilation ของฟอร์มาลดีไฮด์



กระบวนการเกิด formaldehyde oxidation ในจุลินทรีย์ ส่วนมากเกิดจากการผลิตเอนไซม์ aldehyde oxidase ที่สำคัญ คือ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ทำให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์เป็นกรดฟอร์มิก และตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ formate dehydrogenase ในขณะที่กระบวนการเกิด assimilation ของฟอร์มาลดีไฮด์ในจุลินทรีย์ เกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางและนำไปสร้างเซลล์ โดยใช้ pathway ที่สำคัญ คือ 1) serine pathway โดยการนำฟอร์มาลดีไฮด์ 2 โมเลกุล รวมกับ CO<sub>2</sub> 1 โมเลกุล เพื่อสร้างเป็น 2-phosphoglycerate 2) RuMP cycle เกิดโดยการรวม ฟอร์มาลดีไฮด์ 3 โมเลกุล สร้างเป็น glyceraldehyde-3-phosphate

การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นวิธีหนึ่งที่มีความปลอดภัยและมีค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ดังนั้น ในการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการบำบัดสารมลพิษ จึงต้องมีการคัดแยกจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนต่าง ๆ มาทำการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถของจุลินทรีย์นั้น ๆ ในการย่อยสลายสารมลพิษเป้าหมาย โดยค้นหาจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีความสามารถเป็นเอกลักษณ์และสามารถย่อยสลายสารมลพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการปรับตัวและเหนียวทำให้มีระบบเอนไซม์และวิถีทางชีวภาพที่จำเพาะในการย่อยสลายสารมลพิษจะเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว

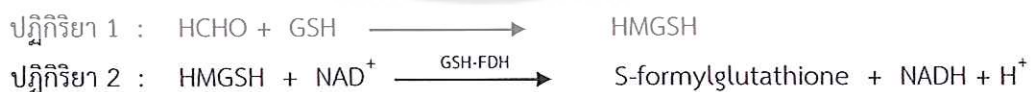
## ระบบเอนไซม์ในการย่อยสลายฟอร์มัลดีไฮด์

การย่อยสลายสารอินทรีย์และสารมลพิษในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะนำคาร์บอนและพลังงานที่ได้จากการย่อยสลายนั้นไปใช้ในการดำเนินวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์ การเจริญและการสร้างเซลล์ใหม่ การดำเนินไปของวิถีเมแทบอลิซึมจำเป็นต้องอาศัยการเร่งปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นไปเป็นพลังงานสำหรับการดำรงชีวิตของเซลล์

การศึกษากระบวนการกำจัดพิษของฟอร์มัลดีไฮด์ในแบคทีเรีย พบว่ามีวิถีการกำจัดพิษโดยใช้ระบบของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 4 ระบบ คือ 1) ระบบ glutathione (GSH)-dependent NAD-linked formaldehyde dehydrogenase (GSH-FDH) พบได้ทั้งในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต (Uotila et al, 1974) (Lee et al, 2002) (Ras et al, 1995) อย่างไรก็ตามสามารถพบเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ชนิดที่ไม่ต้องอาศัย glutathione ได้ใน *Pseudomonas putida* (Tanaka et al, 2002) ระบบที่ 2) คือ formyl-GSH hydrolase (FGH) ระบบที่ 3) มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ในวิถี ribulose monophosphate pathway (RuMP) ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ hexulose phosphate synthase (HPS) และ hexulose phosphate isomerase (HPI) การกำจัดฟอร์มัลดีไฮด์โดยวิธีนี้ ทำให้ได้เซลล์เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนของเซลล์ ทำให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ในวิถี RuMP (Christoserdova et al, 2000) ระบบที่ 4) พบได้ในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยวกลุ่ม Archaeobacteria โดยเอนไซม์กำจัดฟอร์มัลดีไฮด์เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ tetrahydromethanopterin (H4MPT) และ methanofuran (MFR) เป็นโคแฟกเตอร์ (Christoserdova et al, 1998)

### เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase

เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) (EC 1.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบได้ทั้งในแบคทีเรีย *E.Coli* และในมนุษย์ โดยการทำงานของเอนไซม์ต้องอาศัยโคแฟกเตอร์ NAD<sup>+</sup> และ glutathione ในการเร่งปฏิกิริยา สารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาจะอยู่ในรูป S-hydroxymethylglutathione (HMGS) ซึ่งเกิดขึ้นได้เองโดยการรวมตัวของฟอร์มัลดีไฮด์และกลูตาไทโอน ปฏิกิริยานี้ไม่จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ (ปฏิกิริยา 1) และ HMGS ที่เกิดขึ้นจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ glutathione (GSH)-dependent NAD-linked formaldehyde dehydrogenase (GSH-FDH) ต่อไป (ปฏิกิริยา 2)



ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ GSH-FDH สามารถช่วยลดความเป็นพิษของฟอร์มัลดีไฮด์โดยเปลี่ยนฟอร์มัลดีไฮด์ไปเป็นกรดฟอร์มิก ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ Kaulfers และคณะ (Kaulfers et al, 1988) พบว่าเอนไซม์ GSH-FDH มีความสัมพันธ์กับความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อระดับฟอร์มัลดีไฮด์ที่สูงขึ้นภายนอกเซลล์ได้ การศึกษาในเซลล์ *E.Coli* ยืนยันว่าความต้านทานดังกล่าวเป็นผลจากการที่เอนไซม์ GSH-FDH ทำหน้าที่สลายฟอร์มัลดีไฮด์ Gutheil และคณะ (Gutheil et al, 1997) รายงาน

ผลของการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 7.9-264  $\mu\text{M}$  สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ *E. Coli* และ *Haemophilus influenzae* สร้างเอนไซม์ GSH-FDH ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่านั้นจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ การแสดงออกของยีน GSH-FDH ในแบคทีเรียถูกควบคุมที่กระบวนการถอดรหัสของยีน (transcription) ผลการศึกษาโดย Barber และคณะ (Barber et al, 1998b) สนับสนุนการศึกษาดังกล่าว โดยพบว่ากระบวนการถอดรหัสของยีน *adhI* ใน *R.Sphaeroides* จะถูกควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้นเมื่อมีปริมาณของฟอร์มาลดีไฮด์มากขึ้น อย่างไรก็ตามกลไกการแสดงออกของเอนไซม์ GSH-FDH ในแบคทีเรียถูกควบคุมได้จากปัจจัยควบคุมที่ซับซ้อน ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

Echenique JR และคณะ (Echenique et al, 2001) รายงานผลการศึกษา ยีน *adhC1* ใน *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกให้เอนไซม์ GSH-FDH ผลจากการโคลนและศึกษาลำดับเบสของยีน พบว่าใน *Acinetobacter baumannii* มียีนเพิ่มเติมอีก 1 ชุดคือ *adhC2* ที่ถูกถอดรหัสให้เอนไซม์ GSH-FDH เช่นกัน เมื่อทำการแยกโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสยีน *adhC2* พบว่ามีขนาด 46.5 kDa ในขณะที่ *adhC1* ให้โปรตีนที่มีขนาด 45 kDa โปรตีนทั้งสองมีคุณสมบัติของเอนไซม์ GSH-FDH โดยกลไกการแสดงออกของยีน *adhC* ทั้ง 2 ชนิดถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ

นอกจากในแบคทีเรียแล้ว เอนไซม์ GSH-FDH ยังสามารถพบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่นพืช โดยแหล่งของฟอร์มาลดีไฮด์ในพืช อาจเกิดจากกระบวนการ demethylation ของสารเพกทิน (pectin) หรือเกิดจากกระบวนการ decarboxylation ของ glyoxylate ในพืช นอกจากนี้ พืชอาจได้รับฟอร์มาลดีไฮด์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ การปล่อยสารพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม ทั้งนี้ฟอร์มาลดีไฮด์สามารถเข้าไปมีผลต่อเมแทบอลิซึมในกระบวนการการสังเคราะห์แสงของเซลล์ Martinez และคณะ (Martinez et al, 1996) ได้ทำการโคลน cDNA ของเอนไซม์ GSH-FDH ในพืช *Arabidopsis* และพบว่าเอนไซม์ GSH-FDH มีโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกันมากทั้งในพืชและในสัตว์ ยีนที่แสดงออกให้ GSH-FDH เป็นยีนเดี่ยว และอยู่บนโครโมโซมที่ 5 ของจีโนม *Arabidopsis* งานวิจัยของ Achkor และคณะ (Achkor et al, 2003) ได้ศึกษาผลของเอนไซม์ GSH-FDH ในการลดพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ในพืช *Arabidopsis* โดยผู้วิจัยได้ตัดต่อยีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ GSH-FDH ในปริมาณมากเข้าไปในพืช *Arabidopsis* และพบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำลายพิษฟอร์มาลดีไฮด์ได้สูงกว่าพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อยีนถึง 25% ทำให้พืชมีความสามารถในการทนต่อฟอร์มาลดีไฮด์ ความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาการปรับปรุงพืชให้มีความสามารถในการต้านทานสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ต่อไปได้

ดังนั้น ความรู้ในระดับยีน ตลอดจนการศึกษาการแสดงออกของยีนเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในภาวะแวดล้อมที่มีระดับฟอร์มาลดีไฮด์สูง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษากลไกและการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในกระบวนการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ เพื่อที่จะสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการบำบัดสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพต่อไป

## เนื้อหาการวิจัย

ทำการโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH) จากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งแยกได้จากอาคารตองร้างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) โดยทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ด้วยวิธี SDS-PAGE และการตรวจสอบกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) โดยวัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH ต่อหน่วยเวลา



## การดำเนินการวิจัย

### 1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสลายฟอร์มัลดีไฮด์จากดินรอบน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อน้ำตองร่างอาจารย์ใหญ่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหาร formaldehyde enrichment medium ที่ประกอบด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1500 ppm ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) พร้อมกับวัดความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์ที่ลดลงในแต่ละช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารที่มีฟอร์มัลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ

### 2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

ทำการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น โดยการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางตัว เพื่อจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย

### 3. การสกัด RNA ของเชื้อหมายเลข 1 และ 4

ทำการสกัด RNA จากเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มัลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีฟอร์มัลดีไฮด์ โดยขั้นตอนการสกัด RNA เริ่มต้นด้วยการ เติม easy-RED™ Solution ปริมาตร 750 ul ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 200 ul เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ปล่อยให้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนที่มีลักษณะใส ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการเติม Isopropanol 400 ul ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ซึ่งส่วนที่เป็นสารละลายใส ให้เหลือแต่ตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอด จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มล. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ซึ่งสารละลายใส จากนั้นเปิดฝาทิ้งไว้ 15 นาที ขั้นตอนสุดท้ายทำการละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย RNase free water ปริมาตร 20-25 ul

### 4. การสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อหมายเลข 1 และ 4

นำ RNA ที่สกัดได้มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ DyNAmo cDNA synthesis kit (FINNZYME, บริษัท Thermo Fisher Scientific) เพื่อเตรียมชิ้นส่วน cDNA สำหรับขั้นตอนการโคลนยีนต่อไป โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา cDNA synthesis ประกอบด้วย RT buffer, Oligo (dT), M-MuLV Rbase H+ reverse transcriptase enzyme, RNase free water และ Template RNA จากนั้นทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ตามขั้นตอนดังนี้ primer extension ที่ 25 °C เวลา 10 นาที, cDNA synthesis ที่ 37 °C เวลา 30 นาที และ reaction termination ที่ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที

## 5. การโคลนยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH)

ทำการโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH) โดยเริ่มต้นจากการสกัด RNA จากเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ นำ RNA ที่สกัดได้มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วย degenerate primer ที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH) จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูล ทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ตรวจสอบชิ้นยีนด้วย agarose gel electrophoresis สกัดดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ถูกต้องด้วย PCR purification Kit ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี automated sequencing โดยบริษัท 1<sup>st</sup> BASE DNA sequencing service, Malaysia (<http://www.base-asia.com/>) นำผลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank

ทำการหา full-length of FDH cDNA โดยวิธี one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique (Tonooka et al, 2008) โดยทำการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ EcoRI ที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการ dephosphorylation ด้วยเอนไซม์ calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) ที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการ Purification DNA โดยวิธี Phenol-chloroform extraction จากนั้นเชื่อมต่อ genomic DNA ด้วย adaptor (ADP-Eco5' และ 5'-P-ADP-Eco-3') ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ใช้คู่ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วย primer GL\_1 และ specific primer เพื่อเพิ่มขยายชิ้นส่วนยีนแต่ละด้านจนได้ full-length ของ FDH cDNA ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank

นำ full-length ของ FDH cDNA เชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pGEM-T vector และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *E.Coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ heat-shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการ โดยวิธี colony PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank

## 6. การสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ใน pGEM-T มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนเข้าใน expression vector pET32a(+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเช่นเดียวกัน คือ BamHI และ HindIII โดยใช้เอนไซม์เชื่อมต่อคือ T4 ligase ทำการ transform รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET32a(+) เข้าสู่ Origami competent cell (Genotype:  $\Delta$ (ara-leu)7697  $\Delta$ lacX74  $\Delta$ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac+ lacIq pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (StrR, TetR)) ด้วยวิธี heat shock transformation ที่ 42 °C และทำการกระตุ้นโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยการเติม IPTG จากนั้นสกัดโปรตีนจากเซลล์ ตรวจสอบการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วยวิธี SDS-PAGE

การทดสอบสภาวะต่างๆ ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ทำได้โดยปรับเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ ของการกระตุ้น ดังนี้ การปรับความเข้มข้น IPTG ตั้งแต่ 0.1 mM, 0.5 mM และ 1 mM IPTG , การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการเลี้ยงเซลล์ ตั้งแต่ 16 °C, 28 °C, 32 °C และ 37 °C เวลาในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนของเซลล์ ตั้งแต่ 0, 0.5, 2, 4 และ 5 ชั่วโมง

## 7. การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication

นำเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้น ด้วย IPTG ไปปั่นเหวี่ยง 10,000 xg 2 นาที ดูดส่วน supernatant ออก เปรียบเทียบการละลายเซลล์ด้วยสารละลายต่าง ๆ คือ 1XPBS, 1M Arginine (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1M Arginine, pH 9.5), 50 mM Tris-HCl pH 8.0 จากนั้นนำไปแตกเซลล์ด้วยเครื่อง sonicate ตั้งสภาวะเครื่องเป็นเวลา 5 นาที pulse on 15 วินาที pulse off 5 วินาที Amp 60 % และนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และทดสอบ activity ของ enzyme

## 8. การสกัดโปรตีนจากเซลล์โดยใช้ Bugbuster reagent

นำเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้น ด้วย IPTG ไปปั่นเหวี่ยง 10,000 xg 2 นาที ดูดส่วน supernatant ออก จากนั้นทำการเติม Bugbuster Protein Extraction Reagent (Novagen) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม 1x protease 30 ไมโครลิตร และ Benzonase (25 unit) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่อง Shaking บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 16,000 xg 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วน soluble protein ที่ได้จากการสกัดไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และเก็บส่วนที่ไม่ละลายน้ำ มาสกัดส่วน inclusion body ซ้ำอีกครั้ง

การสกัดโปรตีนส่วนที่ไม่ละลาย (inclusion bodies) ด้วย Bugbuster Protein Extraction Reagent (Novagen) โดยการเติม Bugbuster reagent 3 มิลลิลิตร และเติม 1X lysozyme ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม Bugbuster reagent อีกเพื่อเจือจาง (อัตราส่วน 1 : 10 ) vortex ให้เข้ากัน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 16,000 xg เก็บส่วน supernatant และเติม Bugbuster reagent ปริมาณ 2 เท่าของโปรตีนในส่วนที่ไม่ละลาย ทำการ vortex ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 16,000 xg อุณหภูมิ 4 °C เก็บทั้งส่วน cell และ supernatant เพื่อนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ต่อไป

## 9. การทำบริสุทธิ์โปรตีนผ่าน Ni-NTA column

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column เริ่มต้นโดยการเตรียม 50 % slurry Ni-NTA His-bind resins 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 1x Ni-NTA Bind buffer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ resin bead อิ่มตัวด้วย binding buffer จากนั้นดูดส่วนของ supernatant ออก นำส่วนของ soluble โปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนเติมลงใน resin bead ที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นนำไป shaking บนน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง ทำการ pack column ด้วย resin bead ที่มีโปรตีนที่สนใจผสมอยู่ เก็บส่วน protein solution ที่ไม่จับกับ resin bead และผ่านออกมาจาก column เป็น (AP1 fraction) จากนั้นล้างด้วย 1X wash buffer เก็บตัวอย่างเป็น (wash fraction) ขั้นตอนสุดท้ายทำการ elute โปรตีนที่จับกับ resin bead ออกมาด้วย 1X Ni-NTA Elution buffer ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างเป็น (AF fraction; AF1 , AF2 , AF3 และ AF4) นำตัวอย่างแต่ละ fraction ไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และตรวจสอบ activity ของ enzyme

## 10. การเตรียม cleared lysates และทำให้บริสุทธิ์ด้วยสภาวะ denaturing condition

โปรตีนส่วนที่ไม่ละลาย (inclusion bodies) สามารถทำให้ละลายได้ด้วย denaturing condition ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ดังนี้ นำส่วนของ inclusion bodies ที่เตรียมไว้มาละลายด้วย denaturing buffer (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อให้โปรตีนอยู่ในสภาวะละลายหลังจากนั้นทำการ purification โดยผ่านโปรตีนลงใน Ni-NTA ผ่าน column เก็บส่วน flow-through ซึ่งเป็นส่วนโปรตีนที่ไม่

จับกับ Ni-resin bead เป็น fraction P1 ทำการ wash colmn 2 ครั้ง ด้วย Buffer C (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 6.3) เก็บเป็น fraction P2 ขั้นตอนสุดท้ายทำการ elute โปรตีนที่จับกับ resin bead ออกมาด้วย buffer ที่มี pH แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ Buffer D (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 5.9) เก็บเป็น fraction P3 และ Buffer E (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 4.5) เก็บเป็น fraction P4 นำตัวอย่างแต่ละ fraction ไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และตรวจสอบ activity ของ enzyme

### 11. การ refolding protein

นำโปรตีนที่เสียสภาพจากการละลายด้วย denaturing buffer 8 M urea (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 8.0) ทำการ dialysis เพื่อกำจัด urea ออก โดยเติมสารละลายโปรตีนลงใน Amicon Ultra filter tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 xg อุณหภูมิ 4 องศา เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม buffer ที่มีส่วนประกอบของ (1 M Tris-HCl, pH 8.5 , 0.1 mM DTT) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 5,000 xg อุณหภูมิ 4 องศา (ทำซ้ำ 5 ครั้ง) นำโปรตีนที่ผ่านการ dialysis ไปทำให้โปรตีนกลับสภาพ refolding protein โดยเติมสารละลาย additive ต่างๆ ดังตาราง

No.	Additive	Stock conc	Final conc	Volume (ul)	Add Buffer (ul)
1.	glycerol	70%	20%	143	332
2.	TritonX-100	/	1%	5	470
3.	Tween 20	/	1%	5	470
4.	N-Lauroylsarcosine	30%	2%	33	442
5.	PEG	50%	2%	20	455
6.	Glycine	1 M	100 mM	50	425
7.	CuSO <sub>4</sub>	0.5 M	1 mM	1	474
8.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M	200 mM	100	375
9.	cysteine	1 M	5 mM	2.5	470
10.	Cystine	1 M	5 mM	2.5	
11	2+4+6+5+8	/	/	208	267
12	1-11	/	/	362	113
13	Only buffer	/	/	/	475

ทำการเติมสารละลายโปรตีนที่ต้องการทดสอบ refolding protein จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นแยกนำส่วน supernatant ไปตรวจสอบ enzyme activity ต่อไป



## 12. การตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE

เตรียม Separating solution 10 % ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (สำหรับ 2 เจล)

H <sub>2</sub> O	7.9 มิลลิลิตร
30 % Acrylamide mix	6.7 มิลลิลิตร
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.0 มิลลิลิตร
10 % SDS	0.2 มิลลิลิตร
10 % APS	0.2 มิลลิลิตร
TEMED	0.02 มิลลิลิตร

เตรียม Stacking solution 10 % ปริมาตร 6 มิลลิลิตร (สำหรับ 2 เจล)

H <sub>2</sub> O	4.1 มิลลิลิตร
30 % Acrylamide mix	1.0 มิลลิลิตร
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.75 มิลลิลิตร
10 % SDS	0.06 มิลลิลิตร
10 % APS	0.06 มิลลิลิตร
TEMED	0.012 มิลลิลิตร

ทำการ load protein ที่ต้องการตรวจสอบ ในแผ่น SDS-PAGE ต่อกระแสไฟฟ้า 15 Amp ต่อโปรตีน 1 แผ่น และย้อมสีโปรตีนด้วย comassie blue เป็น 20 นาที ทำการ destained จนกระทั่งสามารถเห็นแถบโปรตีน

## 13. การตรวจสอบโปรตีนด้วย western blot

ทำการแยกโปรตีนตามขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากแผ่น gel ไปยัง PVDF membrane โดยมีขั้นตอนการเตรียม PVDF membrane ดังนี้ นำ PVDF membrane แช่ใน methanol และน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปแช่ใน Towbin buffer และเตรียม blotting paper แช่ใน Towbin buffer เช่นกัน จากนั้นทำการ semi-blot โดยวางวัสดุต่าง ๆ ในเครื่อง semi-blot ตามลำดับจากซ้ายขวาไปลงดังนี้ blotting paper 2 แผ่น, membrane, gel และ blotting paper 2 แผ่น ต่อกระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังจากกระบวนการ blotting นำแผ่น PVDF membrane ไป incubate ด้วย blocking solution จากนั้นตรวจติดตามด้วย primary antibody (anti-His-Tag monoclonal Ab) และ secondary antibody (goat anti-Mouse IgG AP) ทำการ ตรวจสอบโปรตีนที่สนใจ ด้วยสารละลาย NBT และ BCIP

## 14. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase

กิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) สามารถตรวจสอบได้โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของโคแฟกเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm ไปปฏิบัติสำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ประกอบด้วย 0.5 mM phosphate buffer, 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NAD, 9 μmol Formaldehyde, 1 mM KCN, 3 mM Glutathione ทำการบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นเริ่มปฏิบัติโดยเติมสารสกัดจากเซลล์ (crude cell extract) ที่ต้องการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของโคแฟกเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น

340 nm เป็นเวลา 5 นาที หนึ่งหน่วยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ วัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH ต่อหน่วยเวลา และรายงานเป็นความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ (specific activity) เทียบต่อหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนที่ทดสอบ

#### 15. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทดสอบโดย Bio-Rad Protein assay (บริษัท BIO-RAD) เป็นการตรวจสอบการจับสีของโปรตีน (dye-binding assay) ด้วย Dye reagent ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm



## ผลการดำเนินการวิจัย

### 1. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารตองร้างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พบแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ คือ ไอโซเลทหมายเลข 1 และหมายเลข 4 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะโคลิเน็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตลอดจนการย้อมสีแกรม เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียเบื้องต้น ได้ผลดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 1 และหมายเลข 4

การศึกษาและทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อไอโซเลทที่ 1 และ ไอโซเลทที่ 4 สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 1 ซึ่งข้อมูลทางชีวเคมีเบื้องต้นสามารถจัดจำแนกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มของจีนัส *Pseudomonas sp.*

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบทางชีวเคมี

	ไอโซเลท No.1	ไอโซเลท No.4
Gram stain	แกรมลบ/ รูปท่อน	แกรมลบ/ รูปท่อน
Oxidase test	+	+
Catalase test	+	+
MR-VP test	-/-	-/-
Glucose fermentation	+	+
Sucrose fermentation	-	-
Lactose fermentation	-	-
Citrate test	+	+
OF test	+,-	+,-

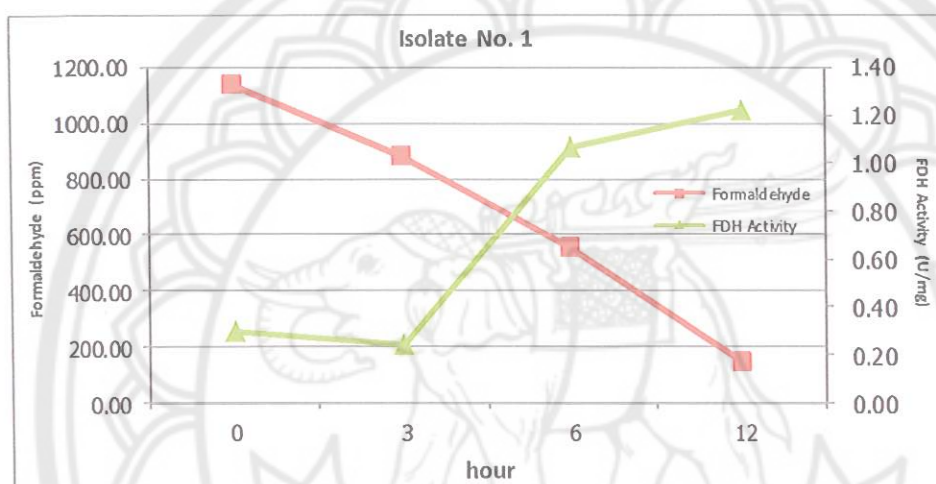
+ คือ มีการเจริญ , - คือ ไม่มีการเจริญ

## 2. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase

เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในเชื้อไอโซเลทที่ 1 (ตารางที่ 2) และไอโซเลทที่ 4 (ตารางที่ 3) พบว่ามีค่าสูงในช่วงเวลาที่ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์มีค่าลดลง โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.24 U/mg เป็น 1.07 U/mg และ 1.22 U/mg เมื่อเพิ่มเวลาการเพาะเลี้ยงจาก 3 ชม. เป็น 6 และ 12 ชม. ในขณะที่มีการลดลงของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อย่างมากที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 2) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มสูงเป็น 1.14 U/mg ที่ช่วงเวลากการเพาะเลี้ยง 6 ชม. กิจกรรมเอนไซม์ที่มีค่าสูงนี้จะมีผลทำให้ฟอร์มาลดีไฮด์ลดลงจาก 938.60 ppm เป็น 577.39 ppm เมื่อเพิ่มเวลาการเพาะเลี้ยงจาก 6 ชั่วโมงเป็น 12 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์และกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ที่ 0, 3, 6 และ 12 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1

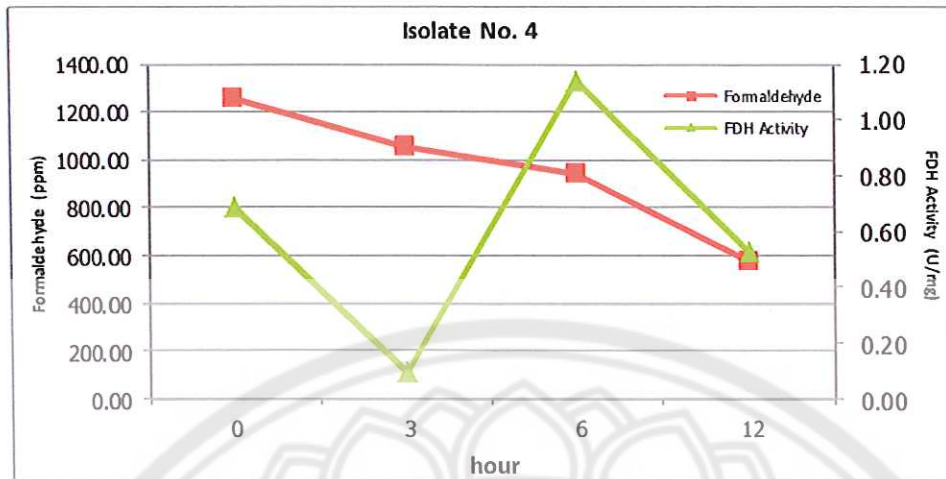
ไอโซเลท No.1		
ชั่วโมง	Formaldehyde (ppm)	FDH Activity (U/mg)
0 hr	1140.35	0.30
3 hr	883.04	0.24
6 hr	554.58	1.07
12 hr	140.94	1.22



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ลดลงและกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ที่เพิ่มขึ้นของเชื้อไอโซเลท 1 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์และกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ที่ 0, 3, 6 และ 12 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 4

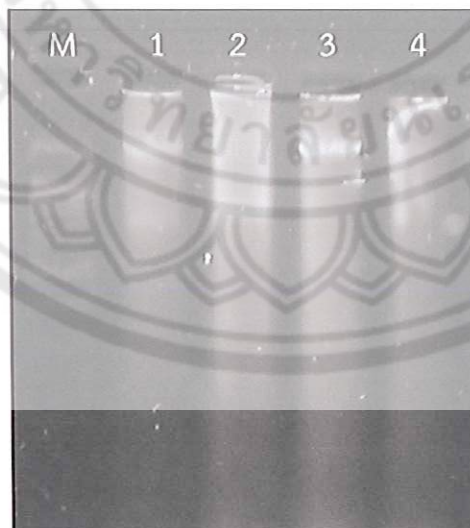
ไอโซเลท No.4		
ชั่วโมง	Formaldehyde (ppm)	FDH Activity (U/mg)
0 hr	1257.31	0.69
3 hr	1058.48	0.10
6 hr	938.60	1.14
12 hr	577.39	0.53



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ลดลงและกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ที่เพิ่มขึ้นของเชื้อไอโซเลท 4 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

### 3. ผลการสกัดอาร์เอ็นเอ

จากการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อหมายเลข 1 และ 4 (รูปที่ 4) สามารถสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อทั้งสองไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งในการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน formaldehyde dehydrogenase จะนำเอาอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์เป็น cDNA และใช้ในการโคลนยีนต่อไป



รูปที่ 4 Gel electrophoresis ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ โดย lane ที่ 1 คือ อาร์เอ็นเอของเชื้อหมายเลข 1 ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ; lane ที่ 2 คือ อาร์เอ็นเอของเชื้อหมายเลข 1 ที่เลี้ยงในอาหาร FMI ; lane ที่ 3 คือ อาร์เอ็นเอของเชื้อหมายเลข 4 ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ; lane ที่ 4 คือ อาร์เอ็นเอของเชื้อหมายเลข 4 ที่เลี้ยงในอาหาร FMI

#### 4. ผลการคัดเลือกคู่ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

การศึกษาเอ็นและการแสดงออกของยีน Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มจำนวนยีนในบริเวณที่สนใจ โดย primer ที่ใช้ในการทำ PCR คือ Degenerate primer โดย FDHF-B1 เป็น Forward primer และมี FDHR-F2 กับ FDHR-H2 เป็น Reverse primer ทั้งหมด 3 ตัวโดยมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

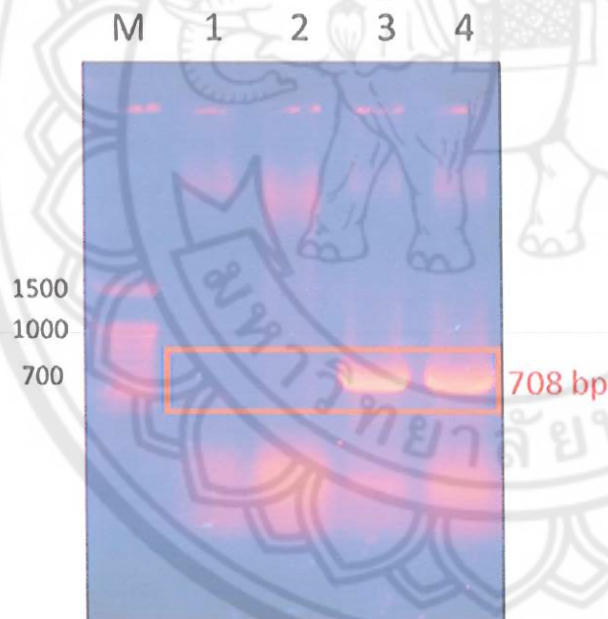
Degenerate primer (Using CODEHOP program for primer design)

FDHF-B1 : 5'-ACATCTGCGGCTCCGAYWNCAYAT-3'

FDHR-F2 : 5'-GGCGCCATCAGGCCNAYNGGNCC-3'

FDHR-H2 : 5'-GCTGGCCTCGAAGCCNACNRCNTC-3'

การศึกษาคู่ primer ที่เหมาะสม โดยศึกษาคู่ primer แรก คือ FDHF-B1 และ FDHR-F2 และคู่ primer ที่สองคือ FDHF-B1 และ FDHR-H2 พบว่า คู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-H2 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการคือขนาด 708 bp ได้ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 Gel electrophoresis ของ PCR product ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร TSA และน้ำดอง โดยใช้คู่ primer ที่ต่างกัน บน 1% agarose gel; lane 1 และ 2 คือ PCR product ที่ได้จากการใช้คู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-F2 ที่เลี้ยงในอาหาร TSA (lane 1) และในน้ำดอง (lane 2); lane 3 และ 4 คือ PCR product ที่ได้จากการใช้คู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-H2 ที่เลี้ยงในอาหาร TSA (lane 3) และในน้ำดอง (lane 4); ขนาดของ PCR product ที่ต้องการคือ 708 bp; M คือ DNA ladder marker

## 5. การตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน Formaldehyde dehydrogenase

หลังจากการทำ PCR จนได้ชิ้นส่วนของยีน Formaldehyde dehydrogenase แล้ว ทำการตัดแถบ PCR product และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing ด้วยวิธี automated sequencing โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing service, Malaysia (<http://www.base-asia.com/>) นำผล DNA sequencing ของเชื้อหมายเลข 1 และ 4 มาเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า มีลำดับเบสที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน Formaldehyde dehydrogenase

## 6. ผลการทำ gene walking

นำเอาดีเอ็นเอส่วนที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ไปทำการเชื่อมต่อด้วย adaptor ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเอนไซม์ T4 ligase จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มจำนวน ชิ้นส่วนของยีน formaldehyde dehydrogenase ได้บางส่วน ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างแบบไม่จำเพาะเจาะจง หรือ non-specific เป็นจำนวนมาก โดย อาจเกิดจากการที่ไพรเมอร์สามารถจับกับ ชิ้นส่วนขนาดเล็กของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แล้วเพิ่มจำนวนจนทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้ ดังนั้นการลดความเข้มข้นของ adaptor ให้น้อยลง จะช่วยลดปริมาณการต่อของ adaptor กับดีเอ็นเอที่ถูกตัดปลายด้วย EcoRI ทำให้ลดปริมาณ smear band ที่เกิดขึ้นได้

## 7. ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ adaptor ในการทำ PCR



รูปที่ 6 : gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดและเชื่อมต่อด้วย adaptor แล้วนำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์ โดย lane ที่ 1, 2 และ 3 เป็นเชื้อหมายเลข 1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB โดยใช้ความเข้มข้นของ adaptor ที่ 200 nM, 50 nM, และ 5 nM ตามลำดับ; lane ที่ 4, 5 และ 6 เป็นเชื้อหมายเลข 1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร FMI โดยใช้ความเข้มข้นของ adaptor ที่ 200 nM 50 nM, และ 5 nM ตามลำดับ; lane ที่ 7, 8 และ 9 เป็นเชื้อหมายเลข 4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB โดยใช้ความเข้มข้นของ adaptor ที่ 200 nM 50 nM, และ 5 nM ตามลำดับ; lane ที่ 10, 11 และ 12 เป็นเชื้อหมายเลข 4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร FMI โดยใช้ความเข้มข้นของ adaptor ที่ 200 nM 50 nM, และ 5 nM ตามลำดับ





จากภาพเป็นผล gel electrophoresis ของการนำเอาดีเอ็นเอส่วนที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ไปทำการเชื่อมต่อกับ adaptor ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเอนไซม์ T4 ligase จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มจำนวน ชิ้นส่วนของยีน formaldehyde dehydrogenase ได้บางส่วน ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างแบบไม่จำเพาะเจาะจง หรือ non-specific เป็นจำนวนมาก โดยอาจจะเกิดจากการที่ไพรเมอร์สามารถจับกับชิ้นส่วนขนาดเล็กของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แล้วเพิ่มจำนวนจนทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้ นอกจากนี้ การที่มีความเข้มข้นของ adaptor มากเกินไป อาจจะส่งผลให้ adaptor เข้าต่อกับดีเอ็นเอตัวอย่างได้มาก ทำให้เกิด PCR product จำนวนมากได้ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึง ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ adaptor ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 200 nM, 50 nM และ 5 nM ในขั้นตอน adaptor ligation และเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์ จากผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ adaptor ในการทำ PCR พบว่า PCR pattern ที่ได้จากทุกความเข้มข้นของ adaptor มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยที่ความเข้มข้นของ adaptor ต่ำ ๆ (5 nM) จะเห็นแถบ PCR product ชัดเจนและพบ smear band น้อยลง ดังนั้นการลดความเข้มข้นของ adaptor ให้น้อยลง จะช่วยลดปริมาณการต่อของ adaptor กับดีเอ็นเอที่ถูกตัดปลายด้วย EcoRI ทำให้ลดปริมาณ smear band ที่เกิดขึ้นได้

## 8. การศึกษาลำดับเบสของยีน Formaldehyde dehydrogenase โดยใช้เทคนิค Whole Genome PCR

การใช้เทคนิค PCR เพื่อ amplified ยีน formaldehyde dehydrogenase ทั้งยีนด้วย cloning primer ซึ่งออกแบบจากฐานข้อมูลของยีน formaldehyde dehydrogenase ของเชื้อแบคทีเรียหลายๆ ชนิด ในการออกแบบจะเพิ่มส่วน restriction site คือ BamHI ใน forward primer และ HindIII ใน reverse primer เพื่อประโยชน์สำหรับการนำไป clone ยีนต่อไป

### 8.1 การทดสอบ annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับคู่ไพรเมอร์

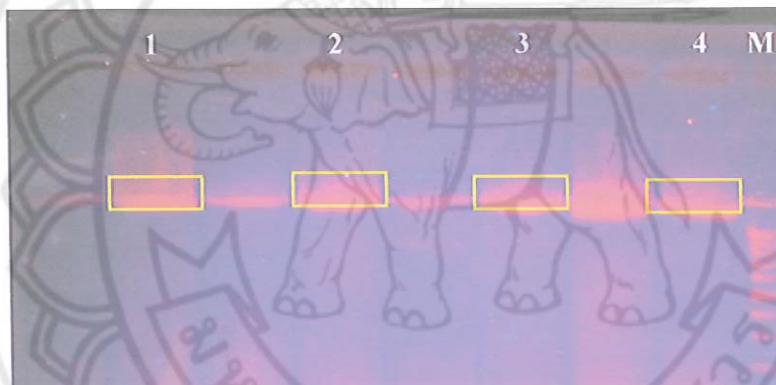


รูปที่ 7 : Gel electrophoresis ของ PCR product จากการเพิ่มปริมาณ gDNA No.1-TSA โดยการทดสอบ annealing temperature ที่อุณหภูมิต่างๆ กันดังนี้ lane 1 และ8 ใช้อุณหภูมิ 53 °C, lane 2 และ9 ใช้ อุณหภูมิ 54 °C, lane 3 และ10 ใช้อุณหภูมิ 5 °C, lane 4 และ11 ใช้อุณหภูมิ 5 °C, lane 5 และ12 ใช้

อุณหภูมิ 57 °C, lane 6 และ 13 ใช้อุณหภูมิ 58 °C โดย Lane 1-6 ใช้คู่ primer All-BamHI\_F และ All-HindIII-R ; Lane 8-13 ใช้คู่ primer 26F และ 1390R

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมของ annealing temperature ในการทำ PCR ของคู่ cloning primer ซึ่งออกแบบจากฐานข้อมูลของยีน formaldehyde dehydrogenase ของเชื้อแบคทีเรียหลายๆ ชนิด โดยออกแบบ All-BamHI\_F และ All-HindIII-R เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน formaldehyde dehydrogenase ทั้งยีน จากรูปที่ 6 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ gDNA No.1-TSA ด้วยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวที่อุณหภูมิต่างๆ กันพบว่าที่อุณหภูมิ 56 °C (lane 4) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณ product ที่มีขนาดตามต้องการ (product ขนาด 1.2 Kb) ได้มากที่สุด โดยในการทดลองนี้ได้ใช้คู่ primer 26F และ 1390R ที่จำเพาะต่อการเพิ่มชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาและมีอยู่ใน genome ของเชื้อมาเป็นยีนที่ควบคุมในการทดลอง โดยสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน 16S rDNA ได้ในทุกตัวอย่าง (lane 8-13) แสดงว่ามีดีเอ็นเอเริ่มต้นอยู่ในทุกตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง

## 8.2 ผลจากการทำพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)



รูปที่ 8 : Gel electrophoresis ของ PCR product โดยใช้คู่ไพรเมอร์ All-BamHI-F และ All-HindIII-R ; lane 1 คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอจากเชื้อ No.1, lane 2 คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอจากเชื้อ No.4, lane 3 คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอจากเชื้อ No.4

เมื่อนำ cDNA จากเชื้อ No.1 และ No.4 มาเป็นแม่แบบดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ primer ที่ใช้คือ All-BamHI-F และ All-HindIII-R โดยทำการเพิ่มชิ้นส่วนยีนโดยใช้ annealing temperature 56 °C ส่วน DNA polymerase ที่ใช้คือ 2X Phusion Flash PCR master mix จากนั้นนำมา run agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน formaldehyde dehydrogenase enzyme ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1200 bp ในทุกตัวอย่าง

## 8.3 ผลการศึกษาลำดับเบสจากเชื้อหมายเลข 1 และหมายเลข 4

นำ cDNA เชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pGEM-T vector และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ E.Coli สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ heat-shock transformation ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการ โดยวิธี colony PCR นำชิ้นส่วนดี

เอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบส ด้วยวิธี automated sequencing โดยบริษัท 1<sup>st</sup> BASE DNA sequencing service, Malaysia (<http://www.base-asia.com/>) ผล DNA sequencing เป็นดังนี้

>1st\_BASE\_935626\_g1\_TSA\_Full\_\_All\_BamHI\_F

NNNNNTNNNNNNNTCGGCGCCGGCAGGTTCGAGGTGCAGAAGATCGACTACCCGAAAATGCAGGACCCACGCGG  
CAAGAAGATCGAGCACGGCGTGATCCTGAAGGTGGTCTCCACCAACATCTGCGGCTCCGACCAGCACATGGTCCG  
TGGCCGCACCACTGCCAGGTTCGGCTTGGTCTGGGCCACGAAATCACCGGCGAGATCGTCGAGAAGGGCCGTGA  
CGTCGAGCGCATGCAGATTGGCGACCTGGTCTCGGTGCCATTCAACGTCGCCTGTGGCCGCTGCCGCTCCTGCAA  
GGAAATGCACACCCGGTGTCTGCCTACCGTCAACCCTGCCCGCGCTGGCGGTGCCTATGGTTACGTGCAGATGGG  
CGACTGGACCGGCGCCAGGCCGAGTACGTGCTGGTGCCGTACGCCGACTTCAACCTGCTGAACTGCCCGAGCG  
CGACAAGGCCATGAAAAAGATCCGTGACCTGACCTGCCTGTCTGACATCCTGCCTACTGGTTACCACGGTGCCGT  
GACTGCCGCGCTTGGCCAGGCAGCACCGTCTACGTTGCCGGTGCCGGCCCGGTCGGTTTGGCTGCCGCTGCCTC  
GGCACGTCTGCTGGCGCTGCTTGCCTCATCGTTGGCGACCTCAACCCAGCCCGCCTGGCTCACGCCAAGTCCCA  
GGGTTTCGAAGTGGTCGACCTGTCCAAGGACACCCCGCTGCACGAGCAGATCGTCGATATCCTCGGCGAGCCTGA  
AGTGGACTGCGCCATCGACGCCGTTGGCTTTCGAGGCCCGCGCCATGGCCACGAAGGTGCCAAGCATGAAGCGC  
CAGCTACCGTGTGAACTCGCTGATGCAGGTTACCCGCGTTGCCGGCAACATCGGTATCCCGGGCCTGTACGTG  
ACCGAAGACCCGGGTGCGGTGGATGCTGCCGCAAGATCGGTGCGCTGAGCATCCGCTTCGGCCTGGGCTGGGC  
NAGTCGCACAGCTCCNCACCCGGCCAG

>1st\_BASE\_941278\_g4\_TSA\_Full\_\_All\_BamHI\_F

ANNNNNCGGNGCNGGCAGGTTCGAGGTGCAGAAGATCGACTACCCGAAAATGCAGGACCCACGCGGCAAGAAGAT  
CGAGCACGGCGTGATCCTGAAGGTGGTCTCCACCAACATCTGCGGCTCCGACCAGCACATGGTCCGCGGTGCGAC  
CACTGCCAGGTTCGGCCTGGTCTGGGCCACGAAATCACCGGTGAAATCGTCGAGAAAAGGCCGCGATGTCGAGCG  
CATGCAGATCGGCGACCTGGTCTCGGTACCCTTCAACGTCGCCTGTGGCCGTTGCCGCTCCTGCAAAGAGATGCA  
CACTGGTGTCTGCCTACCGTCAACCCTGCCCGCGCCGGCGGCCCTACGTTACGTGCAGATGGGCGACTGGAC  
CGGCGGCCAGGCCGAGTACGTGCTGGTGCCGTATGCTGACTTCAACCTGCTGAACTGCCTGAGCGCGACAAGGC  
CATGGAGAAAATTCGTGACCTGACCTGCCTGTCCGACATCCTGCCGACCGGCTACCACGGTGCCGTGACTGCCGG  
CGTTGGCCAGGCAGCACCGTCTATGTCGCCGGTGCCGGCCCCGTCGGCCTGGCTGCTGCTGCCTCGGCACGCCT  
GCTGGGCGCTGCCTGCGTCATCGTCGGCGACCTCAACCCGGCCCGCCTGGCCCATGCCAAGTCCAGGGCTTCGA  
AGTGGTCGACTTGTCCAAGGACACCCCGCTGCACGAGCAGATCGTCGATATCCTCGGCGAGCCGGAAGTGGACTG  
CGCCATCGACGCCGTTGGCTTCGAGGCCCGCGGGCATGGCCACGAAGGTGCCAAGCATGAAGCCCCGGCCACG  
GTGCTGAACTCGTTGATGCAGGTTACCCGCGTTGCCGNAACTCNGTNTCCCGGGCCTGTACGTGACCGAAGATC  
CCGGTGCGGTGGATGCTGCGCCAAGATCAGTGCTNTGAGCATTCGCTTCGGCTAGGTCTGGNTCAGTTCGCAC  
AGNCTTCNACAC

#### 8.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล

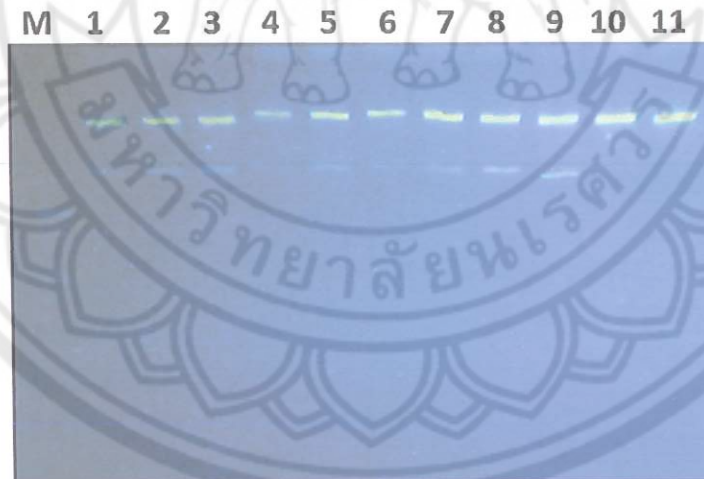
ภายหลังการหาลำดับเบสแล้ว นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ NCBI ได้ผลดังนี้

หมายเลขเชื้อ	Query coverage(%)	Blast result
cDNA No.1	98	<i>Pseudomonas putida</i> HB3267
cDNA No.4	93	<i>Pseudomonas putida</i> HB3267

#### 9. ผลการศึกษาการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์

##### 9.1 ผลการโคลนยีนฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน expression vector

การศึกษาการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของเอนไซม์ฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ทำโดยนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ใน pGEM-T มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ HindIII จากนั้นทำการเชื่อมต่อกันส่วนยื่นเข้าไปใน expression vector pET32a(+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเดียวกัน และทำการ transform รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET32a(+) เข้าสู่ Origami competent cell (Genotype:  $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta(\text{lacX74}) \Delta(\text{phoA}) \text{PvuII} \text{phoR} \text{araD139} \text{ahpC} \text{galE} \text{galK} \text{rpsL} \text{F}'[\text{lac}^+ \text{lacI}^q \text{pro}] (\text{DE3}) \text{gor522}::\text{Tn10} \text{trxB} (\text{StrR}, \text{TetR})$ )

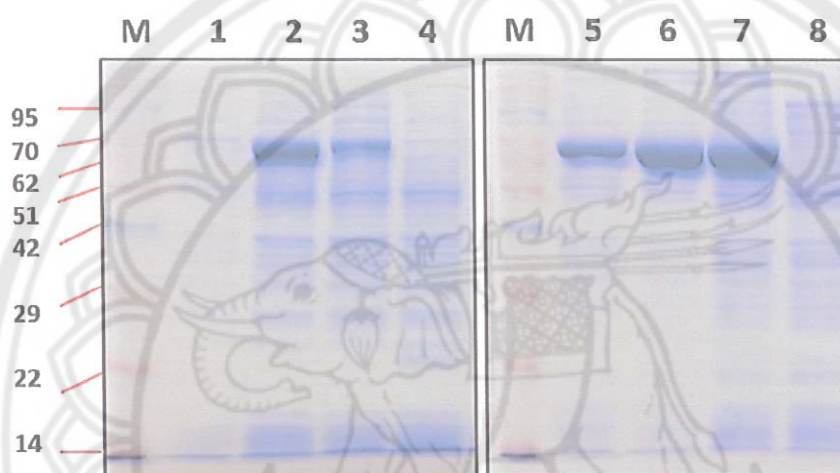


**รูปที่ 9 :** Gel electrophoresis ของการตรวจสอบ recombinant expression clone ของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ใน origami cell; lane 1-5 คือ expression clone ของ pET32a และเอนไซม์ FDH หมายเลข 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI/HindIII, lane 6-9 คือ expression clone ของ pET32a และเอนไซม์ FDH หมายเลข 4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI/HindIII, lane 10-11 คือ pET32a (empty vector) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI/HindIII

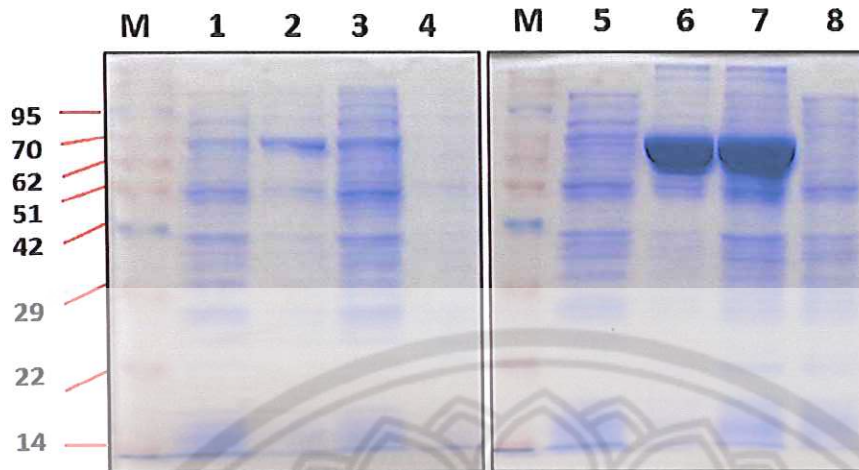
ผลการโคลนยีนฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสหมายเลข 1 และ 4 ใน expression vector pET32a(+) พบว่าสามารถโคลนยีนทั้งหมายเลข 1 และ 4 ได้ เมื่อตรวจสอบโคลนด้วยการตัดเอนไซม์ BamHI/HindIII ได้ยีนที่มีขนาดประมาณ 1200 bp (รูปที่ 9) ซึ่งมีขนาดเท่ากับ insert gene ของเอนไซม์ฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อเปรียบเทียบกับ pET32a (empty vector) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI/HindIII ไม่พบยีนที่มีขนาด 1200 bp

## 9.2 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนฟอร์มัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ทำได้โดยการเติมสาร IPTG เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย จากนั้นสกัดโปรตีนจากเซลล์ และตรวจสอบการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 10 : ผล SDS-PAGE แสดงผลการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) หมายเลข 1 ใน origami cell ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG; lane 1-4 คือโปรตีนจากเซลล์ที่ไม่ได้ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication, lane 5-6 คือโปรตีนจากเซลล์ที่ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication, โดย lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 0 hr.), lane 2 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.), lane 3 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 4 hr.), lane 4 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert), lane 5 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 0 hr.), lane 6 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.), lane 7 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 4 hr.), lane 8 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert)

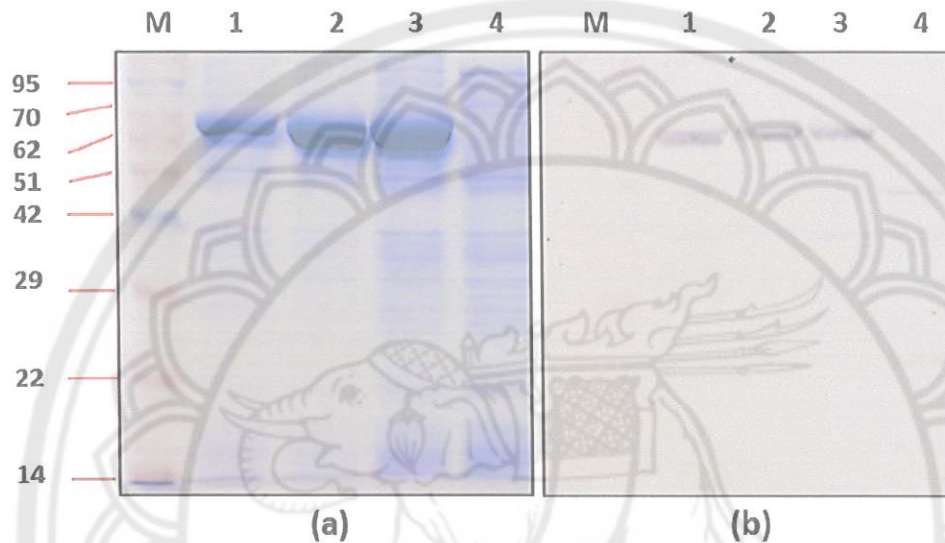


รูปที่ 11 : ผล SDS-PAGE แสดงผลการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) หมายเลข 4 ใน origami cell ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG; lane 1-4 คือ โปรตีนจากเซลล์ที่ไม่ได้ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication, lane 5-6 คือ โปรตีนจากเซลล์ที่ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication, โดย lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 0 hr.), lane 2 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.), lane 3 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 4 hr.), lane 4 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert), lane 5 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 0 hr.), lane 6 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.), lane 7 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 4 hr.), lane 8 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert)

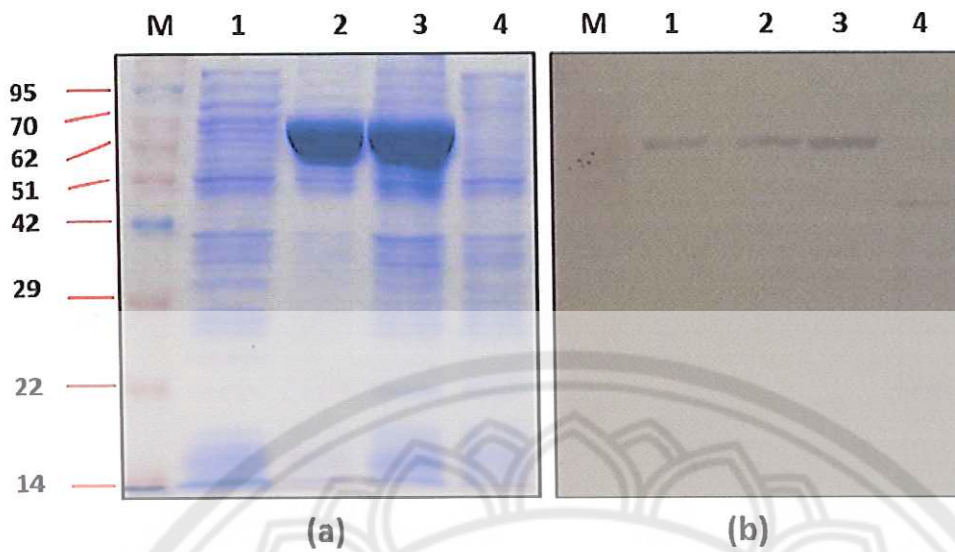
ผลการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ด้วย 1 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37 °C พบการแสดงออกของโปรตีนเอนไซม์ FDH หมายเลข 1 (รูปที่ 10) และ หมายเลข 4 (รูปที่ 11) โดยโปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 65 KDa ซึ่งเป็นขนาดโปรตีน FDH 42 KDa รวมกับขนาดโปรตีนบางส่วนจาก expression pET32a vector โปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นเป็นเวลา 0 ชั่วโมง (Lane 5 รูปที่ 10 และ รูปที่ 11), 2 ชั่วโมง (Lane 6 รูปที่ 10 และ รูปที่ 11) และ 4 ชั่วโมง (Lane 7 รูปที่ 10 และ รูปที่ 11) ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนขนาด 65 KDa ในโคลนที่มีเฉพาะ expression vector pET32a เพียงอย่างเดียว (Lane 8 รูปที่ 10 และ รูปที่ 11) และเมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนจากเซลล์ที่ไม่ได้ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication (Lane 1-3 รูปที่ 10 และ รูปที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนจากเซลล์ที่ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication (Lane 5-7 รูปที่ 10 และ รูปที่ 11) พบว่าโปรตีนจากเซลล์ที่ทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication มีปริมาณโปรตีนมากกว่า ดังนั้นโปรตีนที่แสดงออกน่าจะรวมตัวอยู่ภายในเซลล์ในรูปของ inclusion bodies เมื่อทำการแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง (sonication) จึงพบปริมาณโปรตีนหลุดออกมาจากภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก

### 9.3 ผลการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี western blot

เทคนิค western blot analysis เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis และทำการย้ายโปรตีนไปยังแผ่น membrane ตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดยใช้ specific antibody ในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน FDH ที่ติด His-Tag สามารถใช้ primary antibody เป็น anti-His-Tag monoclonal Ab เพื่อจับจำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ จากนั้นตรวจติดตามด้วย secondary antibody (goat anti-Mouse IgG- AP) ทำการตรวจสอบโปรตีนที่สนใจ ด้วยสารละลาย NBT และ BCIP



รูปที่ 12 : ผลการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) หมายเลข 1 ใน origami cell ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG และทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication ทำการเปรียบเทียบผลแถบโปรตีนด้วยวิธี (a) SDS-PAGE (b) western blot ; โดย lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 0 hr.), lane 2 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.), lane 3 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 4 hr.), lane 4 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert)



รูปที่ 13 : ผลการแสดงผลของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) หมายเลข 4 ใน origami cell ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG และทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication ทำการเปรียบเทียบผลแถบโปรตีนด้วยวิธี (a) SDS-PAGE (b) western blot ; โดย lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 0 hr.), lane 2 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.), lane 3 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 4 hr.), lane 4 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert)

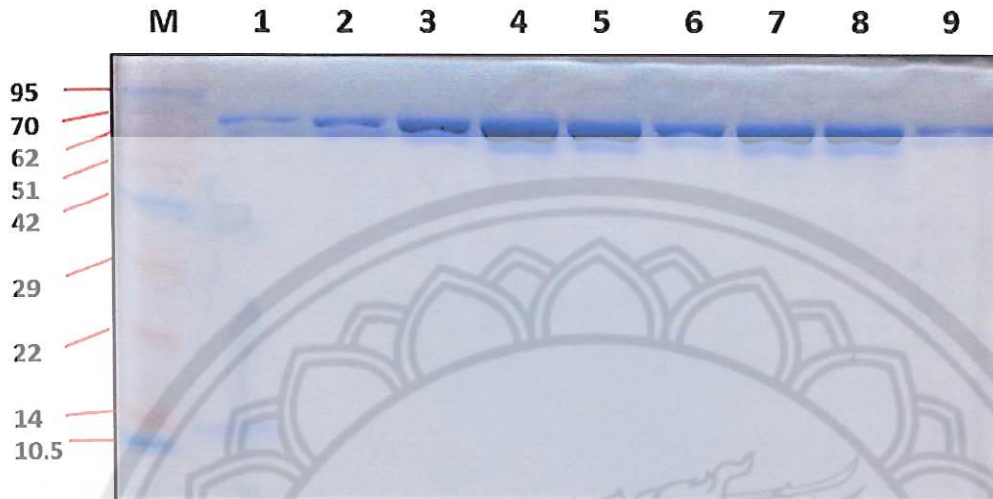
ผลการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี western blot พบว่าสามารถตรวจพบแถบโปรตีนที่มีขนาด 65 kDa จากโคลน pET32a+FDH No.1 เนื่องจากโปรตีนที่สนใจเป็นโปรตีนที่ติด His-Tag ดังนั้นเมื่อใช้ anti-His-Tag monoclonal Ab ตรวจจับ จะสามารถจับจำเพาะกับแถบโปรตีนที่สนใจ และสามารถแสดงผลเป็นแถบโปรตีนที่สนใจ ซึ่งมีขนาด 65 kDa บนแผ่น membrane ได้ ทั้งนี้สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจได้ทุกช่วงเวลา ตั้งแต่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง (รูป 12 (b), lane 1-3) ในขณะที่จะไม่พบแถบโปรตีนขนาด 65 kDa จากโคลน pET32a ที่ไม่มีการโคลนชิ้นยีนของ FDH (รูป 12 (b), lane 4) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ FDH หมายเลข 4 คือสามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจได้ทุกช่วงเวลา ตั้งแต่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง (รูป 13 (b), lane 1-3) ในขณะที่โคลน pET32a ที่ไม่มีการโคลนชิ้นยีนของ FDH จะไม่พบแถบโปรตีนขนาด 65 kDa (รูป 13 (b), lane 4)

#### 9.4 ผลการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยสภาวะ denaturing condition

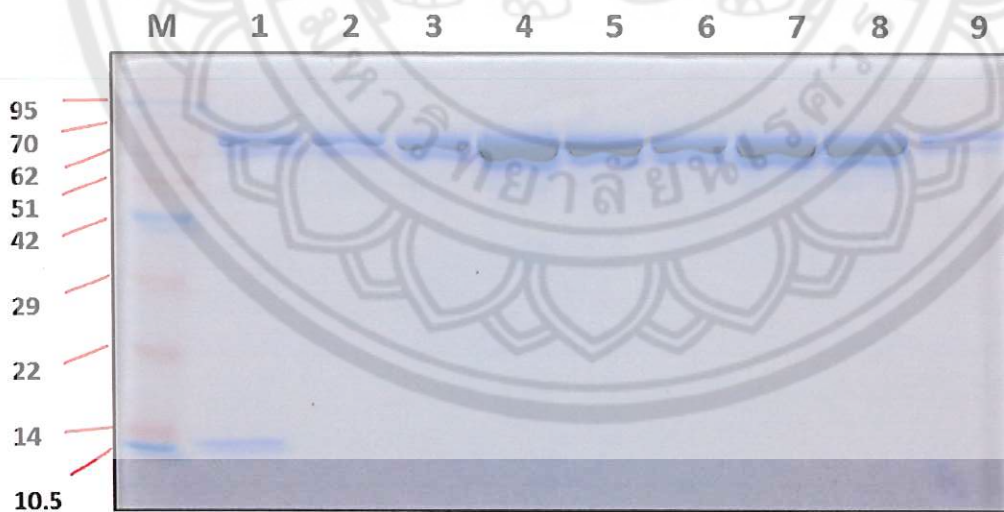
เนื่องจาก recombinant protein อยู่ในรูปที่เป็น inclusion bodies จึงมีผลต่อกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Ni-NTA affinity column ดังนั้นจึงต้องทำให้โปรตีนละลายในสภาวะ denaturing condition โดยการใส่สารละลาย denaturing buffer (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 8.0) เพื่อทำให้โปรตีนอยู่ในสภาวะละลายหลังจากนั้นทำการ purification โดยผ่านโปรตีนลงใน Ni-NTA ผ่าน column เก็บส่วน flow-through ซึ่งเป็นส่วนโปรตีนที่ไม่จับกับ Ni-resin bead เป็น fraction P1 ทำการ wash colmn ด้วย Buffer C (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 6.3) เก็บเป็น fraction P2 ขั้นตอนสุดท้ายทำการ elute โปรตีนที่จับกับ resin bead ออกมาด้วย buffer ที่มี pH แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ Buffer D (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 5.9)



เก็บเป็น fraction P3 และ Buffer E (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 4.5) เก็บเป็น fraction P4 นำตัวอย่างแต่ละ fraction ไปตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE



รูปที่ 14 : ผล SDS-PAGE แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของเชื้อหมายเลข 1 ผ่าน Ni-NTA column; lane 1 คือ flowthrough fraction ที่ผ่านจาก column, lane 2 คือ Wash fraction, lane 3-6 คือ elution fraction ด้วย elute buffer pH 5.9, lane 7-9 คือ elution fraction ด้วย elute buffer pH 4.5



รูปที่ 15 : ผล SDS-PAGE แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของเชื้อหมายเลข 4 ผ่าน Ni-NTA column; lane 1 คือ flowthrough fraction ที่ผ่านจาก column, lane 2 คือ Wash fraction, lane 3-6 คือ elution fraction ด้วย elute buffer pH 5.9, lane 7-9 คือ elution fraction ด้วย elute buffer pH 4.5

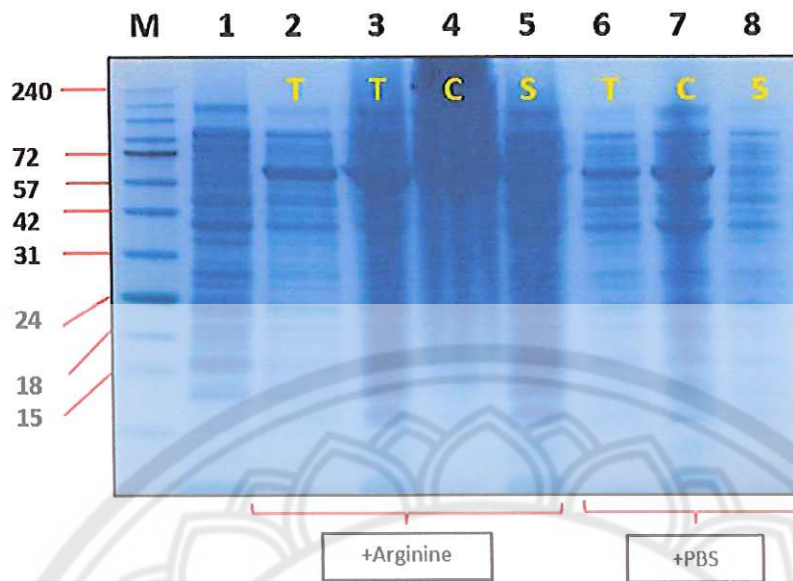
โปรตีนรีคอมบิแนนท์ของเชื้อหมายเลข 1 และหมายเลข 4 สามารถละลายอย่างสมบูรณ์ได้ในสารละลาย denaturing buffer (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 8.0) และเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ni-NTA column พบว่า สามารถ elute โปรตีนได้ด้วย elution buffer pH ต่าง ๆ กัน คือ ที่ pH 5.9 (รูปที่ 14 และรูปที่ 15, lane 3-6) และ ที่ pH 4.5 (รูปที่ 14 และรูปที่ 15, lane 7-9) โดยโปรตีนที่ elute ออกมาได้จาก column เป็นโปรตีนที่มีขนาด 65 kDa ซึ่งเป็นขนาดโปรตีน FDH 42 kDa รวมกับขนาดโปรตีนบางส่วนจาก expression pET32a vector โปรตีนที่สนใจศึกษามี His-Tag ติดอยู่กับโปรตีน จึงสามารถจะจับกับ Ni-NTA ที่บรรจุอยู่ใน column ได้ และสามารถ elute โปรตีนดังกล่าวออกมาจาก column โดยใช้หลักการเปลี่ยนแปลง pH ของ elution buffer เมื่อตรวจสอบแต่ละ fraction ด้วย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่มีขนาดตามที่ต้องการ ดังนั้นโปรตีนที่ได้ จึงเป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์

### 9.5 ผลการ refolding protein

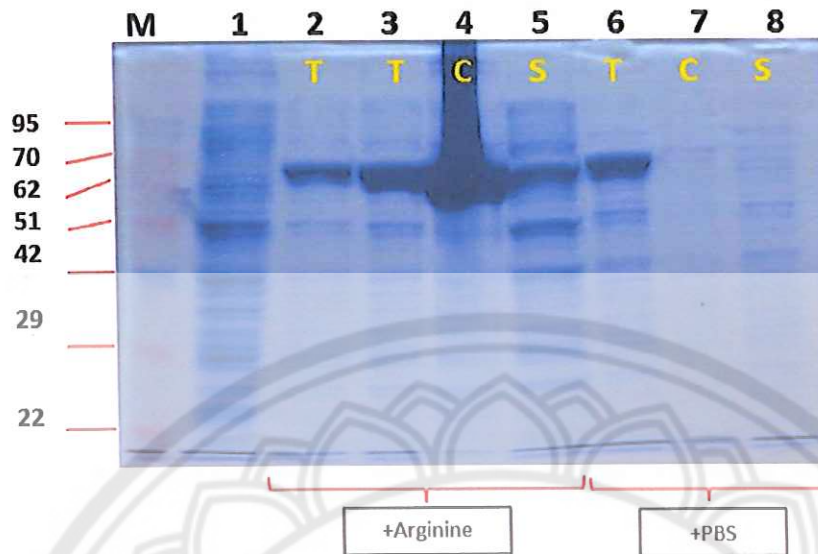
นำโปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพจากการละลายด้วย denaturing buffer 8 M urea (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 Tris-Cl, pH 8.0) ไปทำให้โปรตีนกลับสภาพ refolding protein โดยเติมสารละลาย additive ต่างๆ ดังนี้ glycerol, TritonX-100, Tween 20, N-Lauroylsarcosine, PEG, Glycine, CuSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, cysteine, Cystine และส่วนผสมอัตราส่วนต่างๆ กันของสารละลาย additive ดังกล่าว พบว่าสารละลาย additive ที่เลือก ยังไม่สามารถ refolding protein ให้กลับมามีสภาพที่ทำงานได้ เมื่อตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ จึงไม่พบ FDH activity ของเอนไซม์หลังการ refolding protein

### 9.6 การละลายโปรตีนที่อยู่ในรูป inclusion bodies

โปรตีนในรูปที่ไม่สามารถละลายได้ หรือ inclusion bodies เป็นโปรตีนที่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย Ni-NTA column และตรวจสอบไม่พบ FDH activity เนื่องจากอยู่ในโครงสร้างที่ไม่เหมาะสมหรือการม้วนตัว (folding) ผิดไปจากสภาพธรรมชาติของโปรตีน การทำให้โปรตีนละลายโดยใช้ denaturing buffer ที่มี 8 M urea เป็นองค์ประกอบ มีผลทำให้โปรตีนละลายได้ แต่ผลเสียคือโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และการทำให้กลับสู่สภาพเดิมด้วยวิธีการเติมสารละลาย additive ทำได้ยาก การทดลองก่อนหน้านี้ยังไม่สามารถทำให้โปรตีนกลับมาสู่สภาพเดิมได้ ภายหลังเติมสารละลาย additive ชนิดต่างๆ จึงยังตรวจสอบไม่พบ FDH activity ได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทดสอบหาสารละลายที่ไม่มีคุณสมบัติเป็น denaturing agent เพื่อให้โปรตีนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการละลายได้ โดยทำการเปรียบเทียบการละลายของโปรตีนในสารละลาย Arginine (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 M Arginine, pH 9.5) กับสารละลาย 1X PBS และทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนเซลล์ที่อุณหภูมิที่ต่ำลง คือที่ อุณหภูมิ 28 °C



รูปที่ 16 : ผลการเปรียบเทียบการละลายของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) หมายเลข 1 ใน origami cell ที่อุณหภูมิ 28 °C โดยการกระตุ้นด้วย 0.1 mM IPTG และทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication เปรียบเทียบผลการละลายโปรตีนในสารละลายต่างกัน 2 ชนิดคือ 1 M Arginine และ 1X PBS; โดย lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert), lane 2 คือ โปรตีนจาก Total lysate ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 0 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 3 คือ โปรตีนจาก Total lysate ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 4 คือ โปรตีนจาก cell ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 5 คือ โปรตีนจาก supernatant ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 6 คือ โปรตีนจาก Total lysate ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย PBS, lane 7 คือ โปรตีนจาก cell ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย PBS, lane 8 คือ โปรตีนจาก supernatant ของโคลน pET32a+FDH No.1 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย PBS



รูปที่ 17 : ผลการเปรียบเทียบการละลายของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) หมายเลข 4 ใน origami cell ที่อุณหภูมิ 28 °C โดยการกระตุ้นด้วย 0.1 mM IPTG และทำการแตกเซลล์ด้วยวิธี sonication เปรียบเทียบผลการละลายโปรตีนในสารละลายต่างกัน 2 ชนิดคือ 1 M Arginine และ 1X PBS; โดย lane 1 คือ โปรตีนจากโคลน pET32a (no insert), lane 2 คือ โปรตีนจาก Total lysate ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 0 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 3 คือ โปรตีนจาก Total lysate ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 4 คือ โปรตีนจาก cell ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 5 คือ โปรตีนจาก supernatant ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย Arginine, lane 6 คือ โปรตีนจาก Total lysate ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย PBS, lane 7 คือ โปรตีนจาก cell ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย PBS, lane 8 คือ โปรตีนจาก supernatant ของโคลน pET32a+FDH No.4 (เวลา 2 hr.) ละลายด้วย PBS

การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิที่ต่ำลง คือที่อุณหภูมิ 28 °C มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตช้าลง ส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนช้าลง ทำให้มีปริมาณโปรตีนที่ไม่มากเกินไปที่จะมารวมตัวกันเป็น inclusion bodies ซึ่งอาจทำให้เกิดปริมาณ inclusion bodies ลดลงและทำให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้น ผลการเปรียบเทียบการละลายของโปรตีนในสารละลาย Arginine (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 M Arginine, pH 9.5) และสารละลาย 1X PBS ผลการทดลองของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหมายเลข 1 เป็นไปในทิศทางเดียวกับ ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหมายเลข 4 คือ พบว่าเมื่อใช้สารละลาย Arginine โปรตีนที่สนใจ (ขนาด 65 kDa) สามารถละลายออกมาอยู่ในส่วน supernatant ได้บางส่วน (รูปที่ 16 และรูปที่ 17, lane 5) ในขณะที่เมื่อใช้สารละลาย PBS ไม่พบโปรตีนที่สนใจละลายออกมาอยู่ในส่วน supernatant (รูปที่ 16 และรูปที่ 17, lane 8) ดังนั้นสารละลาย Arginine น่าจะเป็นสารละลายที่เหมาะสมในการละลายโปรตีนที่สนใจให้ออกมาอยู่ในส่วน supernatant ได้ดี โปรตีนที่สามารถละลายได้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษา FDH activity ต่อไป

### 9.7 ผลทดสอบ FDH activity

ข้อจำกัดของการทำให้โปรตีนที่ละลายด้วยสารละลาย Arginine บริสุทธิ์ คือ ไม่สามารถใช้ Ni-NTA column ได้ เนื่องจากสารละลาย Arginine จะเข้าไปแย่งจับกับ Ni-resin bead ทั้งหมด ทำให้โปรตีนที่สนใจไม่สามารถจับกับ Ni-resin bead ได้ ดังนั้นจึงทำการ purify โดยการแยกแถบโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี native gel electrophoresis เพื่อคงสภาพให้โปรตีนอยู่ในสภาพธรรมชาติ จากนั้นทำการตัดแถบโปรตีนที่สนใจมาละลายใน buffer และตรวจสอบ FDH activity ต่อไป

Sample	FDH activity (Unit/ml sample)	Amount of protein ( $\mu$ g)	Specific activity (U/mg)
Crude enzyme	0.016	0.0376	43.329
Pure enzyme	0.0017	0.0656	26.258

ผลการทดสอบ FDH activity พบว่าสามารถตรวจสอบ FDH activity ได้ โดยเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มีค่า specific activity 26.258 Unit/mg protein ในขณะที่ crude enzyme มีค่า specific activity 43.329 Unit/mg protein เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มีค่า specific activity ต่ำกว่า crude enzyme อาจจะเป็นเนื่องมาจากการสูญเสีย yield ของโปรตีนบางส่วนในขณะที่ทำการตัดแถบโปรตีนในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โปรตีน

## Output ที่ได้จากโครงการ

สามารถโคลนยีนและกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Formaldehyde dehydrogenase enzyme ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์สูงได้

Formaldehyde dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ ทำให้ลดความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์สูงได้ การศึกษาการแสดงออกของยีนเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase และตรวจสอบ enzyme activity ในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์สูง โดยศึกษาการแสดงออกของ recombinant Formaldehyde dehydrogenase enzyme (FDH) จากการโคลน recombinant pET32a-cDNA1, และ pET32a-cDNA4 เข้าสู่ BL-21 competent cell เปรียบเทียบกับการ Transformation เข้าสู่ Origami competent cell ซึ่งคุณสมบัติของ Origami cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมให้โปรตีนที่แสดงออกสามารถม้วนตัว (folding) ได้อย่างเหมาะสม และทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน อุณหภูมิที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ รวมทั้งทำการทดสอบสารชนิดต่าง ๆ ที่ช่วยทำให้โปรตีนที่แสดงออกมีคุณสมบัติในการละลายได้ดีขึ้น ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกใน BL21 cell เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมีปริมาณโปรตีนจำนวนมาก แต่เป็นโปรตีนที่อยู่ในรูป inclusion bodies และมีคุณสมบัติไม่ละลาย จึงไม่สามารถตรวจพบ activity ของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ได้ ในขณะที่การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนใน Origami cell ด้วย 0.1 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการแตกเซลล์ด้วยกระบวนการ sonication ในสารละลาย 1 M Arginine solution (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 M Arginine, pH 9.5) พบว่าโปรตีนสามารถละลายออกมาในรูป soluble protein สาร Arginine มีคุณสมบัติทำให้โปรตีนละลายและช่วยทำให้โปรตีนไม่ม้วนตัวเป็น inclusion bodies (Tsumoto K, 2004) และนำไป purify ผ่าน Ni-NTA column ได้ แต่สารละลาย Arginine อาจจะมีผลไปรบกวนการจับระหว่างโปรตีนกับ Ni-resin bead ทำให้โปรตีนที่ purify ได้มีปริมาณน้อย เมื่อนำไปตรวจสอบตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ได้ค่า 26.25 U/mg protein ดังนั้นจึงควรหาวิธีการ purify recombinant FDH ให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากขึ้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการโคลนยีน FDH ทั้งหมด (full length) รวมทั้งความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน recombinant Formaldehyde dehydrogenase จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพต่อไป

## เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Achkor H, Diaz M, Fernandez MR, Biosca JA, Pares X and Martinez C (2003) Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132: 2248-2255
- Barber RD, Donohue TJ (1998b) Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene. *J Mol Biol* 280 : 775-784
- Christoserdova L, Gomelsky L, Vorholt JA, Gomelsky M, Tsygankov YD and Lidstrom ME (2000) Analysis of two formaldehyde oxidation pathways in *Methylobacillus flagellatum* KT, a ribulose monophosphate cycle methylotroph. *Microbiology* 146: 3762-3769
- Christoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK and Lidstrom ME (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. *Science* 281: 99-102
- Echenique JR, Dorsey CW, Patrino LC, Petroni A, Tolmasky ME and Actis LA (2001) *Acinetobacter baumannii* has two genes encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase : evidence for differential regulation in response to iron 147 : 2805-2815
- Gutheil WG, Kasimoglu E and Nicholson PC (1997) Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in *Escherichia Coli* and *Haemophilus influenzae*. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 693-696
- Kaufers PM and Wollman A (1988) Cloning and expression of formaldehyde resistance from *Escherichia Coli*. *FEMS Microbiol Lett* 55: 299-302
- Lee BH, Sakai Y, and Kato N (2002) Physiological role of the glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology* 148: 2697-2704
- Martinez MC, Achkor H, Persson B, Fernandez MR, Shafqat J, Farres J, Jornvall H, and Pares X (1996) *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase: molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insight into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenase. *Eur J Biochem* 241: 849-885
- Mitsui R, Omori M, and Tanaka M (2004) Formaldehyde-Limited Cultivation of a Newly Isolated Methylotrophic Bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic Analysis Related to C1 Metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1, 18-22
- Ras J, Ophem V, Reijnders WN, Van Spanning RJ, Duine JA, Stouthamer AH and Harms N (1995) Isolation sequencing and mutagenesis of the gene encoding NAD and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans* in which GD-FALDH is essential for methylotrophic growth. *J. Bacteriol* 177: 247-251
- Tanaka N, Kusakabe Y, Ito K, Yoshimoto T, and Nakamura KT (2002) Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenase. *J Mol. Biol.* 324: 519-533

Tonooka Y, Mizukami T, Fujishima M (2008) One-base excess adaptor ligation method for walking uncloned genomic DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 173-180

Uotila L, and Koivusalo M (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. *J. Biol. Chem.* 249: 7653-7663





**ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่**

Poster : Thapakorn Somboon, Kajonsak Jaroenchai, Patcharin kraikitraj, Apinun Limmongkon. Expression and solubilization of formaldehyde dehydrogenase recombinant protein from formaldehyde enriched wastewater bacteria. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 2-3, 2014. Bangkok, Thailand.

Poster : Apinun Limmongkon, Pornpan Pookrai, Monthon Yimyai, Suthipong Chuchan, Chayawat Paonoo, Panompan Thathong, Wipaluk Dangjai. Cloning and Expression Analysis of Formaldehyde Dehydrogenase Gene for Formaldehyde Detoxification. The 4<sup>th</sup> International Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 2-3, 2014. Bangkok, Thailand.





**Abstracts and Proceedings**

**The 4<sup>th</sup> International Biochemistry  
and Molecular Biology Conference**

Rama Gardens Hotel & Resort, Bangkok, Thailand

**April 2-3, 2014**

**Bridging ASEAN Biochemical Research Communities**

**Organized by**

**Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand  
Biochemistry and Molecular Biology Section of the Science Society of Thailand  
under the Patronage of His Majesty the King**



BP-06

## Cloning and Expression Analysis of Formaldehyde Dehydrogenase Gene for Formaldehyde Detoxification

Apinun Limmongkon<sup>\*</sup>, Pompan Pookrai, Monthon Yimyai, Suthipong Chuchan, Chayawat Paonoo, Panompan Thathong and Wipaluk Dangjai

Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

<sup>\*</sup> Corresponding Author: [apinun1007@yahoo.com](mailto:apinun1007@yahoo.com)

Formaldehyde is a toxic chemical in the environment. The formaldehyde degradation microorganisms were isolated from wastewater of the preservation of cadavers used in medical education. The formaldehyde oxidizing enzyme; formaldehyde dehydrogenase (FDH), plays an important role in formaldehyde detoxification. The cloning and expression of FDH gene from formaldehyde enriched wastewater bacterial isolation was studied. Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The PCR product of partial 708 bp fragment was confirmed to FDH gene by sequencing and BLAST search analysis. Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique. The coding sequence consisted of 1200 bp encoding a polypeptide of 399 amino acid and shows high sequence identity (95 %) with *Pseudomonas putida* HB3267 FDH gene. These results indicated that FDH isolated gene from formaldehyde enriched wastewater bacteria may be involved in formaldehyde detoxification and play important roles in response to high formaldehyde stresses.

**Keywords:** cloning, degenerate primers, formaldehyde dehydrogenase, gene expression

# Cloning and Expression Analysis of Formaldehyde Dehydrogenase Gene for Formaldehyde Detoxification



Apinun Limmongkon<sup>1\*</sup>, Pornpan Pookrai<sup>2</sup>, Monthon Yimyai<sup>3</sup>, Suthipong Chuchan<sup>3</sup>, Chayawat Paonoo<sup>3</sup>, Panompan Thathong<sup>3</sup>, Wipaluk Dangjai<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, THAILAND

\*Corresponding Author: apinun1007@yahoo.com



## Abstract

Formaldehyde is a toxic chemical in the environment. The formaldehyde degradation microorganisms were isolated from wastewater of the preservation of cadavers used in medical education. The formaldehyde oxidizing enzyme; formaldehyde dehydrogenase (FDH), plays an important role in formaldehyde detoxification. The cloning and expression of FDH gene from formaldehyde enriched wastewater bacterial isolation was studied. Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The PCR product of partial 708 bp fragment was confirmed to FDH gene by sequencing and BLAST search analysis. Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique. The coding sequence consisted of 1200 bp encoding a polypeptide of 399 amino acid and shows high sequence identity (95%) with *Pseudomonas putida* HB3267 FDH gene. These results indicated that FDH isolated gene from formaldehyde enriched wastewater bacteria may be involved in formaldehyde detoxification and play important roles in response to high formaldehyde stresses.

## Introduction

To address the problem of formaldehyde pollution, the microorganisms from formaldehyde polluted wastewater were isolated and studied. There are several enzyme systems used for biological detoxification of formaldehyde. The main enzyme responsible for detoxify formaldehyde is formaldehyde dehydrogenase (FDH) which catalyze to formate. This reaction is considered the essential function for cell viability against formaldehyde.



The purpose of the present study was to study the gene expression and clone the FDH gene from formaldehyde polluted wastewater isolated bacteria.

## Results

### Formaldehyde degradation and FDH activity of bacterial isolate

The bacterial isolate has high potential to degrade toxic formaldehyde and the FDH enzyme tend to response for formaldehyde detoxification.

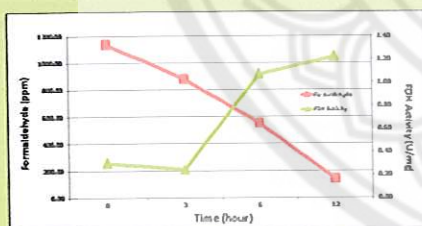


Figure 1. Formaldehyde degradation and crude FDH activity of bacterial isolate within 12 hours culture inoculation.

### Cloning and sequencing of FDH gene

Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique.

Degenerate primer (Using CODEHOP program for primer design)  
 FDHF-B1: 5'-ACATCTGCGGCTCCGAYYWNCAAYT-3'  
 FDHR-H2: 5'-GCTGGCCTCGAAGCCNACNRCNTC-3'

## References

Tonooka Y, Mizukami Y, Fujishima M (2008) One-base excess adaptor ligation method for walking uncloned genomic DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:173-180

## Acknowledgements

This research is supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) and Research Fund from Naresuan University.

### 3. Gene expression analysis

RT-PCR (lane 4) represent the FDH gene expression induced by formaldehyde while no FDH gene induction in culture media without formaldehyde (lane 3). Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment.

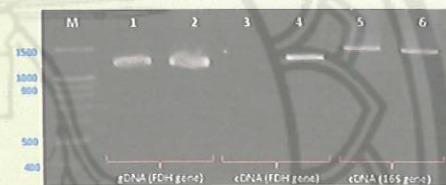


Figure 2. PCR product of FDH gene (lane1-4) and 16S reference gene (lane 5-6) from bacterial culture isolate; lane 1: gDNA (culture without formaldehyde), lane 2: gDNA (formaldehyde enriched culture), lane 3: cDNA (culture without formaldehyde), lane 4: cDNA (formaldehyde enriched culture), lane 5: cDNA (culture without formaldehyde), lane 6: cDNA (formaldehyde enriched culture),

### 4. FDH sequence of bacterial isolate

The coding sequence shows high sequence identity (95%) with *Pseudomonas putida* HB3267 FDH gene.

```

1      ATG TCF GGC AAT CGT GGA GTG GTA TAT CTC GGC GGC GGC AAG GTC GAG GTG CAG AAG ATG GAC TAG
   57  CCG AAA ATG CAG GAC CCA CGC GGC AAG AAG ATC GAG CAG GGC GTG ATC CTG AAG GTG GTC TOC ACC AAC ATC TOC
   142  P K M Q D E R G K F I E H G V I L K V V S T N I C
   G S D Q H M V R G R T T A Q V G D L V L G H E I T G
217  GAA ATC GTC GAG AAA GGC CGG GAT GTC GAG GGC ATG CAG ATC GGC GAG GTG TCG GTA CCG TTC AAC GTC GGC
   E I V E E E H W D R I M A E V V G V Q I G D L V S V F H V A
292  TCT GGC CGT TCC CGC TCC TCC AAA GAG ATG CAC ACT GGT GTC TCC CTC ACC GTC AAC CCT ACC CGC GGC GGC GGC
   C G R C R S C K E M H T G V C L T V N P A R A G G G
367  GGC TAC GGT TAC GTC GAC ATG GGC GAC TGG ACC GGC CAG GGC GAG AAA ATT CGT GAC CTG ACC TOC CTG TCC GAC ATC CTG
   A Y G Y V D M G D W T G G Q A E Y V L V P Y A D F
442  AAC CTG CTG AAA CTG CCT GAG GGC GAC AAG GGC ATG GAG AAA ATT CGT GAC CTG ACC TOC CTG TCC GAC ATC CTG
   N L L T L P E R D K A M E R I R D L T C L S D I L
517  CCG ACC GGC TAG CAG GGT GGC GTG ACT GGC GTT GGC CCA GGC AAG ACC GTC TAT GTC ACC GGT GGC GGC GGC
   E I V E E E H W D R I M A E V V G V Q I G D L V S V F H V A
592  GTC GGC CTG GCT GCT GCT GGC TCG GCA CGC CTG CTG GGC GCT GGC TCC GTC ATC GTC GGC GAC CTC AAC CGG GGC
   V G L A A A S A R L L G A A C V I V G D L M P A
667  CGC CTG GGC CAT GGC AAG TOC CAG GGC TTC GAA GTG GTC GAC TTG TOC AAG GAC ACC CGC CTG CAG GAG CAG ATC
   R L A H A K S Q G F E V V D L S C D Y F L H E Q I
742  GTC LAT ATC CTC GGC GAG CGA GAG GAG TOC GGC ATC GAC GGC GTT GGC TTC GAG GGC CGC GGC CAT GGC CAC
   V D I L G E F E V D C A I D A V G F E A E G H G H
817  GAA GGT GGC AAG CAT GAA GGC CGG ACG GTG ATG ATG TGG ATG CAG GAT ACC CGC GGT GGC GGC AAC ATC
   E G A K H E A P A T V L N S L M Q V T R V A G N I
892  GGT ATC CGG CGC CTG TAC GTG ACC GAA GAT CGC GGT GGC GTG GAT GCT GGC ACC AAG ATG GGT GGC TTG ACG ATT
   G I F G L Y T E D P G A V D A A K I G A L S I
967  CGC TTC GGC CTG GGC TGG GGC AAG TOC CAG ACC TFC CAC ACC GGC CAG ACC CGC ACC ATG AAG TAC AAC CGC CAG
   R F G L G W A K S H S F H T G Q T P T M K T N R Q
1042  TTG ATG CAG GGC ATC ATG TGG GAC CGT ATC AAC ATC GGC GAA GTG GTT GGC GAG CAG GTG ACC AAC GTC CAG
   L H Q A E H W D R I M A E V V G V Q I G D L V S V F H V A
1117  GCG CGG GAA GGT TAY GGC GAG TTC GAT GCA GGT GTC CCG AAG AAG TTC GTT ATT GAC CAG CAC AAG ATG TGG GCG
   A P E G T G E F D A G V P K K F V I D E H K M W G
1192  GCG GCG TAA
      A A stop
    
```

## Conclusion

These results show that FDH from the bacterial isolated has the capacity to take up and detoxify high concentration of formaldehyde and is proportionally related to the FDH activity. Revealing the essential role of FDH enzyme in formaldehyde detoxification. Gene expression studied indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment and the coding sequence of FDH gene shows high sequence identity (95%) with *Pseudomonas putida* HB3267 FDH gene.

