อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

Cloning and characterization of the heavy metal binding domain fusion protein for bioremediation of heavy metal

การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนผสมจาก heavy metal binding domain เพื่อใช้ในการกำจัดโลหะหนัก

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 23 มี.ค. 2555
เลขทะเบียน 1.5739068
เลขเรียกหนังสือ Q QR
2553

หัวหน้าโครงงานวิจัย

ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
สารบัญ	i
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ (Introduction)	3
วิธีดำเนินการวิจัย (Material and Method)	7
ผลการวิจัย (Result)	13
อภิปรายผลการวิจัย(Discussion)	38
สรุปผการวิจัยและการนำผลงานวิจัยไปใช้ในอนาคต	40
เอกสารอ้างอิง (References)	41
กิตติกรรมประกาศ	47
Output ที่ได้จากโครงการ	48
ภาคผนวก	49

สารบัญตาราง (List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1.	สายพันธ์ของแบคทีเรีย และ plasmids ที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้	8
ตารางที่ 2.	Primers ที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้	9
ตารางที่ 3	แสดงเปอร์เซ็นต์ของ recombinant metal binding protein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักเทียบกับ total protein ของ *E. coli* BLR(DE3)	25
ตารางที่ 4	ตารางที่ 4 แสดงผลของปริมาณโปรตีนต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein	28
ตารางที่ 5	แสดงผลของอุณหภูมิต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein	29
ตารางที่ 6	แสดงผลของ pH ต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein	30
ตารางที่ 7	แสดงผลความคงทนต่ออุณหภูมิ (thermal stability) ของ recombinant metal binding protein	32

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

รูปที่ 1 PCR product ยีน *mcsA* 15

รูปที่ 2 ligation product ที่ได้จากการต่อ mcsA และ histidine-rich metal binding domain 16

รูปที่ 3 PCR product fusion gene *mcsA* และ histidine-rich metal binding domain 17

รูปที่ 4 SDS-PAGE analysis ของการคัดเลือก Clone ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ 20

รูปที่ 5 SDS-PAGE analysis ของการสร้างโปรตีน fusion metal binding domain และHis rich domain จาก *S. aureus* ในช่วงเวลาต่างๆ 21

รูปที่ 6 SDS-PAGE analysis ของ recombinant metal binding protein ในการจับกับโลหะหนัก 23

รูปที่ 7 ผลของโลหะหนัก $CuSO_4$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif 34

รูปที่ 8 ผลของโลหะหนัก $CdCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif 35

รูปที่ 9 ผลของโลหะหนัก $CoCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif 36

รูปที่ 10 ผลของโลหะหนัก $ZnCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed 37

heavy metal binding domain CXXC motif

บทคัดย่อ

โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโลหะหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อนำไปกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม โปรตีนที่มี CXXC motif เป็นโปรตีนโดเมนที่สามารถจับกับโลหะหนักได้หลายชนิด และพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในงานวิจัยนี้ได้ทำการ โคลนและ overexpressed โปรตีนที่มี CXXC motif ที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนักจาก *mcsA* gene ของ *S. aureus* ใน *Escherichia coli* และศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในสภาวะต่าง ๆเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้โปรตีนหรือเซลที่มีการแสดงออกของโปรตีนในการกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนที่มี CXXC motif มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนัก Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} และ Zn^{2+} การศึกษาความคงทนของโปรตีนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ºC, 45 ºC, 65 ºC และ 85 ºC ที่มีผลต่อการจับโลหะหนักพบว่าโปรตีนยังมีความสามารถในการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} หลังจากบ่มโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ 85 ºC เป็นเวลา 30 นาที การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลระหว่างการจับของโปรตีนกับโลหะหนักพบว่าที่อุณหภูมิ 65 ºC โปรตีนสามารถจับกับโลหะ Cu^{2+} แต่ไม่สามารถจับกับโลหะ Cd^{2+}, Co^{2+}, และ Zn^{2+} ได้ขณะที่ pH 3-7 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการจับกับโลหะหนักของโปรตีน เซล *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่มี CXXC motif พบมีความทนต่อโลหะหนัก $CuSO_4$ และ $CdCl_2$ เพิ่มขึ้น ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าโปรตีนที่มี metal binding domain (CxxC motif) มีความสามารถกับการจับโลหะหนักได้หลายชนิดและคุณสมบัติในการจับโลหะหนักมีความทนต่อสภาวะแวดล้อมเช่น pH และอุณหภูมิ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนไปใช้ในการศึกษาเพื่อกำจัดโลหะหนัก ต่อไปในอนาคต

Abstract

A number of heavy metal-binding protein in microorganisms has been used to study bioremediation. CxxC motif metal binding domain is the protein that contained Cys-X-X-Cys motif which are capable to bind various type of heavy metals. We have cloned and overexpressed the heavy metal binding domain CxxC motif recombinant protein from mcsA gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. We study the factors involving the metal binding activity in different condition in order to analyze the potential of the recombinant protein for bioremediation. The recombinant protein can bound to Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+}. Thermal stability of the recombinant protein was tested at 37 ºC, 45 ºC, 65 ºC and 85 ºC . The results shown that the metal binding activity to Cu^{2+} and Zn^{2+} still present after treatment the protein at 85 ºC for 30 min. Temperature and pH that affect the metal binding activity was tested and the results showed that recombinant protein bound to Cu^{2+} at 65 ºC whereas the pH 3-7 do not affect the metal binding. *E. coli* harboring pRset with heavy metal binding domain CXXC motif increased heavy metal resistance against $CuSO_4$ and $CdCl_2$. The results from our study shown that metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein can bind effectively to various types of heavy metals and this metal binding domain may be used as a potential tool for study bioremediation.

บทนำ (Introduction)

ปัญหามลพิษจากการปนเปื้อนโลหะหนักชนิดต่างๆ เช่น แคดเมียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ปรอท สารหนูและสังกะสีในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่สำคัญและนับวันจะทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเนื่องจากการมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศทั้งภาคอุตสาหกรรม การคมนาคมขนส่ง เกษตรกรรม และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาทางสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ ก่อให้เกิดผลกระทบกับประชากรที่อาศัยอยู่ในชุมชนเหล่านั้น ในประเทศไทยมีหลายพื้นที่ที่พบมีการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นแหล่งนิคมอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น น้ำเสียที่ปล่อยจากนิคมอุตสาหกรรม จังหวัดระยองและนิคมอุตสาหกรรมจังหวัดปทุมธานีพบมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น นิกเกิลและสังกะสี ในปริมาณสูง มีการปนเปื้อนของแคดเมียมใกล้พื้นที่บริเวณ โรงงานอุตสาหกรรมที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก (Juwa *et al*., 2008) มีการปนเปื้อนของสารตะกั่วในลำห้วยคลิตี้ล่าง ที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี (ชวิพรรณ และภนิตดา, 2551) ส่งผลทำให้เกิดมีการปนเปื้อนของสารพิษโลหะหนักในตะกอนดิน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติเกินค่ามาตรฐานสิ่งแวดล้อมและค่าที่อนุญาตให้มีการบริโภค มีผลเสียต่อระบบนิเวศน์วิทยาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น

Bioremediation เป็นการนำวิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะจุลินทรีย์มาใช้ในการบำบัดสารเคมี น้ำมันและโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Bonaventura & Johnson, 1997) ในการกำจัดโลหะหนักมีหลายวิธีที่ใช้ศึกษาและทดลองอยู่ในห้องปฏิบัติการเช่น การศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อโลหะหนักจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนเพื่อนำมาช่วยในการกำจัดโลหะหนัก (Pepi *et al*., 2007; Haferburg & Kothe 2007; De *et al*., 2008; Rehman, *et al*., 2008) วิธี Phytoremediation ซึ่งเป็นการทดลองใช้พืชที่ทนต่อโลหะหนักและสามารถสะสมโลหะหนักมา

ช่วยบำบัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม (Gleba *et al.*, 1999; Pandey *et al.*,2007; Arshad *et al.*, 2008; Lone *et al.*, 2008) การใช้พืชร่วมกับแบคทีเรียโดยเฉพาะพวก Rhizobacteria มาช่วยในการส่งเสริมการกำจัดโลหะหนัก (Glick, 2005; Khan, 2006; Rani *et al.*, 2008) ปัจจุบันมีความพยายามในการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) และพันธุวิศวกรรม (DNA engineering) มาพัฒนาเพื่อช่วยลดความเป็นพิษ และช่วยในการกำจัดโลหะหนักชนิดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม เช่น การทดลองใช้แบคทีเรียที่ผ่านขั้นตอนทางพันธุวิศวกรรมมาใช้หรือใช้ร่วมกับพืชในการกำจัดโลหะหนัก หรือการศึกษาให้แบคทีเรียที่มีการ express microbial cell surface ของโปรตีนที่จำเพาะมาใช้ในการดูดซับสารและโลหะหนัก (Wu, *et al.*, 2006; Zhuang, *et al*, 2007; Saleem *et al.*, 2008) Heavy metal binding protein คือโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักชนิดต่างๆ ได้อย่างจำเพาะ เช่น Heavy metal binding domain ที่มี CxxC motif ของโปรตีน CopA และ metallochaperone จาก *S. aureus* สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับคอบเปอร์ โคบอลต์ และแคดเมียม (sitthisak *et al.*, 2007) และ metal binding peptide ที่มี sequence เป็น Gly-His-His-Pro-His-Gly (HP) และ Gly-Cys-Gly-Cys-Pro-Cys-Gly-Cys-Gly (CP) สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโลหะหนักแคดเมียม (Kotrba *et al.*, 1999) โปรตีนที่มี Histidine-rich metal binding domain สามารถจับกับคอบเปอร์ได้อย่างจำเพาะ (Battistoni *et al.*, 2001) การศึกษาจนถึงปัจจุบันนี้พบ Heavy metal binding protein ได้หลายชนิด เช่น cysteine rich-metallothioneins (MTs) (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Gupta *et al.*, 2002) Glutathione (GSH) (Penninckx , 2002) และ GSH-related phytochelatin (PCs) (Cobbett & Goldsbrough, 2002) โดย Metallothioneins เป็นโปรตีนขนาดเล็กจากพืชสัตว์และจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำขนาดประมาณ 6.5 kDa,

61-62 amino acid residues โดยมี amino acid พวก cysteine ประกอบอยู่(Cobett & Goldsbrough, 2002; Vasak, 2005) ส่วนพวก Glutathione (GSH: L-gamma-glutamyl-L-cysteinylglycine) เป็นเปปไทด์ที่จับกับโลหะหนักได้โดย Reduced glutathione (GSH)สามารถ form stable complexes ได้ทั้งกับ hard และ soft metal ions (Krezel & Bal, 1999) GSH-related phytochelatin (PCs) เป็น enzymatically synthesized peptides ที่โครงสร้างประกอบด้วย Glu-Cys จึงมีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักได้ดีกว่าพวก Metallothioneins (Mehra & Mulchandani, 1995; Cobett & Goldsbrough, 2002) นอกจากนี้ synthetic phytochelatin (Ecn) ยังถูกนำมาศึกษาและพบว่าสามารถช่วยเพิ่มการสะสมของโลหะหนักได้ (Bae *et al.*, 2001)

ปัจจุบันมีความพยายามหลายวิธีเพื่อช่วยกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม เช่นการใช้พืชหรือจุลินทรีย์หรือใช้พืชร่วมกับจุลินทรีย์มาช่วยในการกำจัดโดยให้มีการสะสมโลหะหนัก (Bioaccumulation) ในเซลของพืชหรือจุลินทรีย์เหล่านั้น โดยในธรรมชาติพบพืชและจุลินทรีย์สามารถสร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติจับกับโลหะหนัก (Heavy metal binding protein) ได้หลายชนิด เช่น โปรตีนที่มี Histidine-rich metal binding domain, cysteine rich-metallothioneins (MTs), Glutathione (GSH) และ GSH-related phytochelatin (PCs) จากความก้าวหน้าของเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในปัจจุบันจึงมีการพัฒนานำเอาเทคนิคทางเหล่านี้มาศึกษาเพื่อช่วยในการกำจัดโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อม มีการตัดต่อยีนที่จับกับโลหะหนักได้ใส่ในแบคทีเรียหรือพืชและนำในศึกษาการกำจัดโลหะหนักได้ในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในระดับโมเลกุลเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการใช้ purified โปรตีนที่ได้จาก Heavy

metal binding domain มาต่อรวมกันและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนในการจับกับโลหะหนัก รวมทั้งปัจจัยอื่นๆที่อาจมีผลต่อการจับของโลหะหนักชนิดต่างๆ กับโปรตีน

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่มีความทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆรวมทั้งโลหะหนักได้ดีโดย ในแบคทีเรีย *S. aureus* จะพบ Heavy metal binding domain ที่ N-terminal ของโปรตีน copper-transporting ATPase ซึ่งมีทั้งที่เป็นแบบ Histidine-rich metal binding domain และ cysteine rich- metal binding domain ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่ต้องการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ของ Heavy metal binding domain และศึกษาคุณสมบัติและปัจจัยในการจับกับโลหะหนักของโปรตีนนี้และความรู้จากงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำ heavy metal binding fusion protein มาใช้เป็นประโยชน์ในการผลิตสารดูดซับโลหะหนักหรือสารกรองโลหะหนักที่ปนเปื้อนในธรรมชาติในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย (Material and Method)

1) สายพันธ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธ์แบคทีเรียที่ใช้ครั้งนี้คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109, DH5α และ BL21 (DE3) PLysS และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC12600 และ SH1000 (ตารางที่ 1) โดย *E. coli* จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria- Bertani broth (LB) และ *S. aureus* ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase-Soy –broth (TSB)

2) cloning and overexpression ของ metal binding domain จาก *S. aureus* ในแบคทีเรีย *E. coli*

2.1 Cloning ของ metal binding domain จาก *S. aureus* ในแบคทีเรีย *E. coli*

สร้าง primer ที่จำเพาะกับส่วน heavy metal binding domain จาก histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33) ของยีน copper-transporting ATPase จากแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธ์ ATCC 12600 และ cysteine rich- metal binding domain (amino acid 1-86) ของยีน copper-transporting ATPase จากแบคทีเรีย *S. aureus*สายพันธ์ SH1000 (ตารางที่ 1) จากนั้นชิ้นส่วนของยีนทั้งสองส่วนจะถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCRโดยใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วน heavy metal binding domain และชิ้นส่วนยีนทั้งสองจะถูกนำมาต่อกันโดยใช้เอ็นไซม์ ligase จากนั้นทำการ clone ชิ้นส่วนของยีน heavy metal binding domain ที่ต่อกันใน PCR2.1 vector และ subclone ใน pRSETa จากนั้น plasmid ที่มีชิ้นส่วนของยีน heavy metal binding domain จะถูก transformed ใน *E. coli* BL21 (DE3) PLysS (Novagen).

ตารางที่ 1 สายพันธ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธ์แบคทีเรีย	ลักษณะ	แหล่งที่มา
S. aureus strains		
SH1000	NCTC 8325-4 with rsbU mutation repair	Horsburgh *et al.*, 2002
ATCC 12600	a laboratory strain of *S. aureus*	Kakudo *et al.*, 1992
E. coli strains		
JM109	*rec* A1 *sup*E44*endA*1*hsdR17 gyrA96 relA1*	Promega
	*thi*Δ (*lac-proAB*) F' (*traD36proAB+ lacIQ* Z Δ M15)	
BL21(DE3)	(pLyS) F- *ompT hsdSB(rB-m-B) gal dcm*	Promega
Plasmids		
TA vector	PCR cloning vector, Amp^r	RBC biosciences, Taiwan
pRSETa	Overexpression vector, Amp^r	Invitrogen

ตารางที่ 2. Primers ที่ใช้ในการศึกษา

gene	Primer name	Primer sequence 5'-3'
mcsa	Mcsa-F (*Bam*HI)	GCGGATCCGGTGCTTTGTGAAAATTGT CAACTTAA
	Mcsa-B (*Hind*III)	GCAAGCTTTTATGC GTCATCATGTTGCAC
copA	His-F(*Hind*III)	GAAGCTTATGGAGCATCATAGTCAT CAAGAAC
	His-B(EcoRI)	GCGAATTCAGCCCCTGATAAAAATGGCTT

- The restriction sites are indicated by underline

2.2 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ heavy metal binding domain metal binding domain จาก *S. aureus* ใน *E. coli*

ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ heavy metal binding domain ใน *E. coli* แบคทีเรียจะถูกเลี้ยงใน LB ที่มี ampicillin และ chloramphenicol ที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่ง OD_{600} ถึง 0.5 จากนั้นเติม IPTGให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.0 mM และเลี้ยงเซลเป็นเวลา 3 ช.ม. หลังจากนั้นเซลจะถูกปั่นเก็บ ล้างด้วย lysis buffer ที่เย็น(20mM Tris, pH 7.4 containing 145 mM NaCl) และ Pelletsจะถูกทำให้แตกโดยใช้ sonicator (Branson Sonifier 450) และ cell debris จะถูกแยกออกโดย centrifugation ที่ 10,000Xg ที่ 4 °C. supernatants จะนำไป แยกโปรตีนโดยใช้ nickel-charged agarose affinity columns (Novagen) และ eluted โปรตีนออกมาด้วย 200-400 mM imidazole แต่ละ fractions ของโปรตีน จะถูกนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford assay และ 12.5 % SDS-PAGE Fractions ที่มี โปรตีนจะถูกนำมา รวมกันและ dialyzed ด้วย 25 mM Tris, pH 8.0 ที่มี 100 mM sucrose, 50 mM NaCl และ 1 mM DTT. ปริมาณโปรตีนจะถูกหาโดยวิธี Bradford assay ก่อนนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

3 การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain และ *E.coli* crude extract ที่มี metal binding domain fusion proteinโดยใช้ iminodiacetic acid-agarose chromatography.

Iminodiacetic acid-agarose คอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ถูก equilibrated กับโลหะหนักชนิดต่างๆที่ต้องการทดสอบจะถูกนำมาใช้ในการศึกษา ความสามารถในการจับของ heavy metal binding protein กับโลหะหนักตามวิธีของ Lutsenko และคณะ (1997). วิธีการคือคอลัมน์จะ

ถูกบรรจุด้วย iminodiacetic acid-agarose (Sigma) 100 µl และล้างด้วย 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) จากนั้นคอลัมน์จะถูก equilibrated ด้วยสารละลายของโลหะหนักชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 mM ($CdCl_2$, $CuCl_2$, $CoCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$ และ $FeCl_3$) ใน 50 mM sodium phosphate buffer ปริมาตร 10 เท่าของ iminodiacetic acid-agarose และคอลัมน์จะถูกล้างด้วย sodium phosphate buffer เพื่อกำจัด metal ions ที่มากเกิน จากนั้น purified heavy metal binding proteinปริมาณ 100 µg หรือ 1 mg ของ *E.coli* crude extract จะถูกนำมาใส่ในคอลัมน์และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที คอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก จากนั้นคอลัมน์จะถูกล้างด้วย 500 µl sodium phosphate buffer และ เก็บโปรตีนที่มีการจับกับโลหะหนักโดยการชะล้างโปรตีนออกมาโดยใช้ 50 mM EDTA ใน sodium phosphate buffer ปริมาตร 100 µl ตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากช่วงการล้างด้วย EDTA และช่วงที่เก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก (unbound) จะถูกนำไปเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ vacuum centrifuge และนำมาวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE. ปริมาณ total protein ใน crude extract และ โปรตีนที่มีการจับกับโลหะหนักกับปริมาณโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักจะวัดโดยใช้ชุดวัดโปรตีน (Bio-Rad)

4. **การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนทท์โปรตีน** metal binding domain **ของโปรตีน ในสภาวะต่าง ๆ**

ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาการจับของรีคอมบิแนส์โปรตีน metal binding domain กับโลหะหนัก ชนิด $CuSO_4$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ ในสภาวะต่างๆ โดยเตรียมคอลัมน์ที่ถูก

equilibrated ด้วยสารละลายของโลหะหนักชนิดต่างๆ จากนั้น รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain 100 µg จะนำมาทดสอบกับโลหะหนักในสภาวะต่างๆ ได้แก่

1) ความร้อนที่ 37°C , 45°C , 65 °C เป็นเวลา 10 นาที (thermal stability testing)

2) สารละลายที่มี pH ต่างๆ ได้แก่ pH 3,5,7,9 เป็นเวลา 10นาที

จากนั้นตรวจการจับกับโลหะหนักด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2

5. ความคงทน (stability) ต่ออุณหภูมิของ recombinant metal binding protein

ในการศึกษาความคงทน (stability) ต่ออุณหภูมิที่มีผลต่อการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนส์โปรตีน metal binding domain โปรตีนจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนนำไปทดสอบการจับกับโลหะหนักชนิด $CuSO_4$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ ด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2

6. การศึกษาผลของโลหะหนักที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ heavy metal binding domain metal binding domain

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ heavy metal binding domain metal binding domain และแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีแต่ plasmid pRSETa มาปรับความขุ่นที่ OD_{600} ให้เท่ากับ 0.1 แล้วนำ 100 µl ไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และโลหะหนักชนิดต่างๆได้แก่ CuCl2, CdCl2, ZnCl2 และ CoCl2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer

ผลการวิจัย (Result)

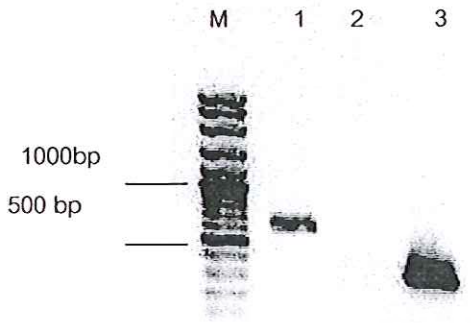
1. การ สร้าง fusion protein ของ *mcsA* จาก *S. aureus* strain SH1000 กับ histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33)จาก *S. aureus* strain ATCC12600 ใน แบคทีเรีย *Escherichia coli*

1.1 ยีน *mcsA* จาก *S. aureus* ที่มี cysteine rich metal binding domain อยู่ 4 domain ได้ถูก clone โดยใช้ oligonucleotide primers mcsA-F1 และ mcsA-B1โดยสังเคราะห์ให้มี restriction site *Bam*HI site ที่ปลาย 5' end และ *Hind*III site ที่ปลาย 3' ของ DNA fragment (GCGGATCCGGTGCTTTGTGAAAATTGT CAACTTAA และ GCAAGCTTTTATGC GTCATCATGTTGCAC) การทำ PCR จะใช้ *S. aureus* genomic DNA strain SH1000 เป็น template ได้ PCR product ขนาด 567 bp ตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 1 เลนที่ 1 จากนั้น PCR product จะถูกตัดด้วย restriction enzyme *HindIII* เก็บไว้ที่ 4 ^{o}C

1.2 ทำ PCR ส่วน histidine-rich metal binding domain (amino acid 1-33)จาก *S. aureus* strain ATCC12600 โดยใช้ oligonucleotide primers His-F1 และ His-B1 โดยสังเคราะห์ให้มี restriction site *Hind*III site ที่ปลาย 5' end และ *EcoRI* site ที่ปลาย 3' ของ DNA fragment (GAAGCTTATGGAGCATCATAGTCAT CAAGAAC และ GCGAATTCAGCCCCTGATAAAAATGGCTT) การทำ PCR จะใช้ *S. aureus* genomic DNA strain ATCC12600 เป็น template ได้ PCR product ขนาด 221 bp ตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 1 เลนที่ 3 จากนั้น PCR product จะถูกตัดด้วย restriction enzyme *HindIII* เก็บไว้ที่ 4 ^{o}C

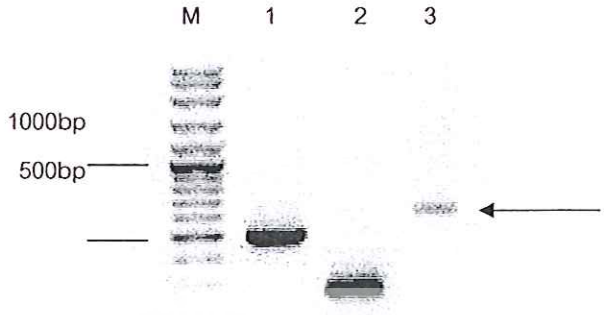
1.3 ทำ ligation PCR ส่วน *McsA* fragment (size 520 bp)กับ PCR ส่วน histidine-rich metal binding domain (size 748 bp) จากนั้นทำ PCR โดยใช้ oligonucleotide primers mctsR-F1 และ His-B1 โดยใช้ ligation product เป็น template (รูปที่ 2) ผล PCR ของ fusion gene ได้ PCR product ขนาดประมาณ 750 bp ตามที่ต้องการ ดังแสดงดังรูปที่ 3 จากนั้น PCR product ของ fusion gene fragment จะถูก cloned ใน PCR vector (Invitrogen) คัดเลือกโคลนที่มี fusion gene โดยการทำ PCR โดยใช้ primer mcsA-F1 และ His-B1 จากนั้นส่ง positive clone ทำ DNA sequencing เพื่อเช็ค Open reading fram ของ fusion gene

1.4 นำ plasmid TA ที่มี fusion gene มาตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำไป subclone ใน pRSETa โดยใช้*Bam*HI และ *Hind*III sites แล้วนำไปใส่ใน *E.coli* strain JM109 จากนั้นคัดเลือก positive clone โดยการทำ colony PCR และ plasmid ที่แยกได้จาก positive clone ของ *E.coli* strain JM109 จะถูก transformed ใน แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) PLysS (Novagen) พร้อมกับคัดเลือก positive clone โดยการทำ colony PCR อีกครั้งและ คัดเลือกหา clone ที่มีการ express protein ออกมาในขนาดที่ต้องการ



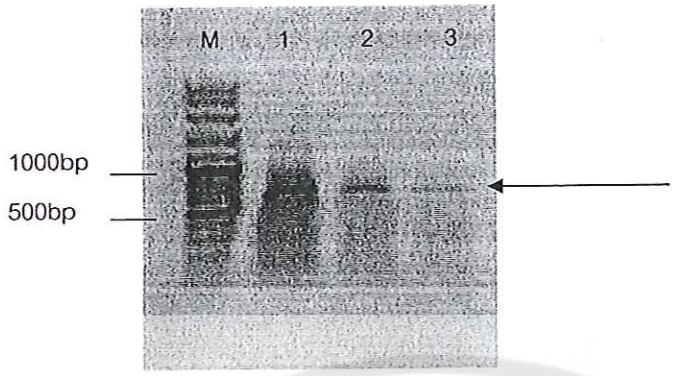
รูปที่ 1 PCR product ยีน *mcsA*

PCR product ของ *mcsA* (527 bp) และ histidine-rich metal binding domain (221 bp) และตรวจดูโดยใช้ 1% agarose gel eletrophorsis. LaneM ได้แก่ DNA maker, Lane1 คือ PCR product ของ *mctsRa*. ยีน Lane2 ได้แก่ negative control with no DNA template ของ mctsRa gene Lane3 คือ PCR product ของ histidine-rich metal binding domain Lane4 ได้แก่ negative control with no DNA template ของ histidine-rich metal binding domain



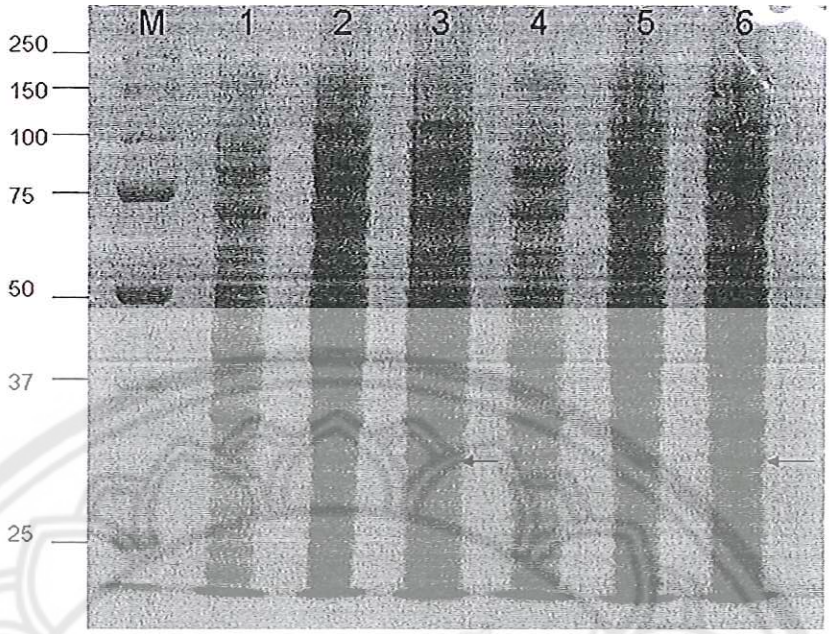
รูปที่ 2 ligation product ที่ได้จากการต่อ *mcsA* และ histidine-rich metal binding domain

ligation product ขนาด 750 bp ที่ได้จากการต่อ *mctsRa* และ histidine-rich metal binding domain ตรวจดูโดยใช้ 1% agarose gel eletrophorsis. LaneM ได้แก่ DNA maker, Lane1 คือ PCR product ของ *mcsA* ยีน Lane2 ได้แก่ PCR product ของ histidine-rich metal binding domain Lane 3 ได้แก่ ligation product ที่ได้จากการต่อ *mctsRa* และ histidine-rich metal binding domain (ลูกศรชี้)



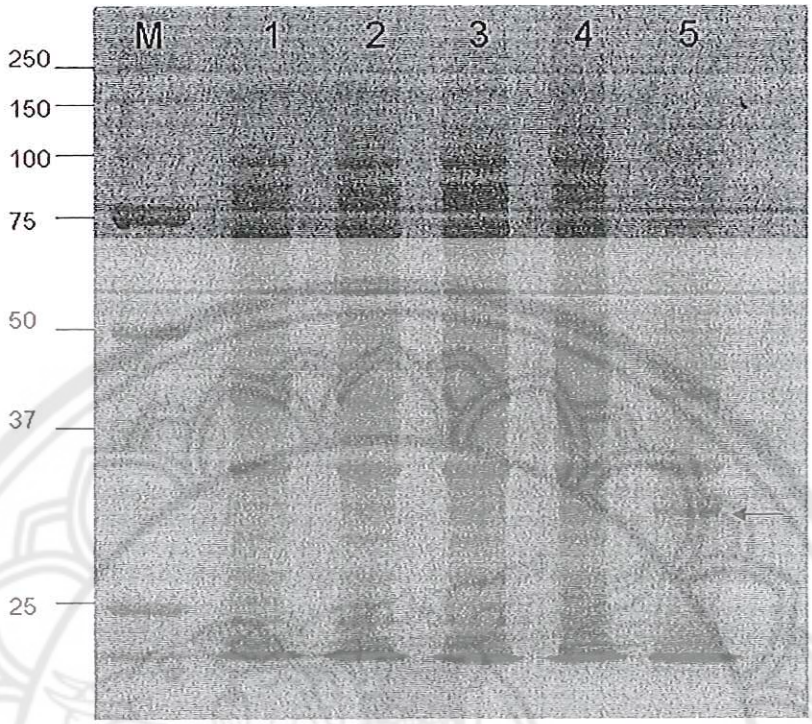
รูปที่ 3 PCR product fusion gene *mcsA* และ histidine-rich metal binding domain PCR product ของ fusion gene *mcsA* (527 bp) และ histidine-rich metal binding domain (221 bp) โดยใช้ ligation product ที่ได้จากการต่อ *mctsRa* และ histidine-rich metal binding domain และตรวจดูโดยใช้ 1% agarose gel eletrophorsis. LaneM ได้แก่ DNA maker, Lane1,23 คือ PCR product ของ fusion gene *mcsA* และ histidine-rich metal binding domain (750 bp) clone 1,2, 3(ลูกศรชี้)

จากนั้น ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะนำมาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet buffer ต้ม 5 นาทีและนำตัวอย่างโปรตีนไป run SDS-PAGE โดยใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue ผลดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าที่ 1.5, 3, 4.5 ช.ม. ชักนำให้มีการสร้างโปรตีนในปริมาณน้อยโดยมีสภาวะที่ดีที่สุดในการชักนำให้มีการสร้างโปรตีนที่การบ่มข้ามคืนที่ 25 °C (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 SDS-PAGE analysis **ของการคัดเลือก** Clone **ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนทท์ของ** fusion metal binding domain **และ**His rich domain **จาก** *S. aureus* **ในแบคทีเรีย** *Escherichia coli*

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB brothจนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 4 ช.ม. และ 25 ^{o}C ข้ามคืน แล้ว นำ 1 ml ของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลามาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet ใส่ 1X SDS-sample buffer ต้ม 5 นาทีและนำ ตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue Lane M, molecular weight marker; lane 1, *E. coli* uninduced extract control (ก่อนเติม IPTG) ของโคลนที่ 1 ; lane 2, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 4 ชั่วโมง ของโคลนที่ 1; lane 3, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 25 ^{o}C ข้ามคืน ของโคลนที่ 1; lane 4, *E. coli* uninduced extract control (ก่อนเติม IPTG) ของโคลนที่ 2 ; lane 5, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 4 ชั่วโมง ของโคลนที่ 2; lane 6, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce IPTG 25 ^{o}C ข้ามคืน ของโคลนที่ 1
ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพ (M) คือ molecular weight masses (kDa).

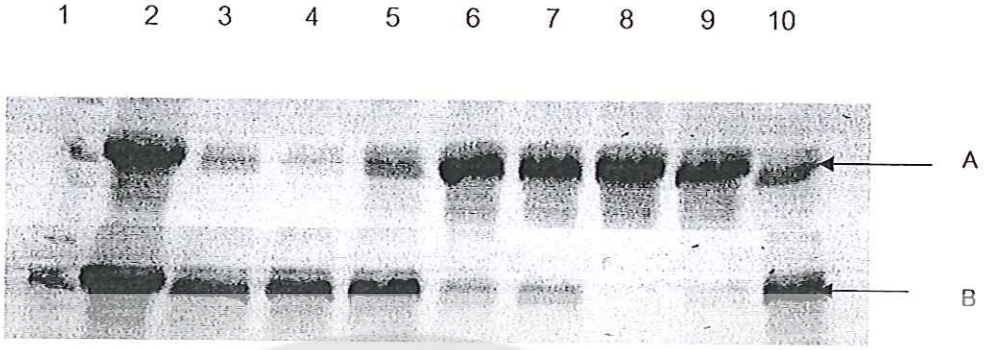


รูปที่ 5 SDS-PAGE analysis ของการสร้างโปรตีน fusion metal binding domain และ His rich domain จาก *S. aureus* ในช่วงเวลาต่าง ๆ

แบคทีเรีย จะถูกเลี้ยงใน LB brothจนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 จากนั้นเก็บ 1 ml culture เพื่อใช้เป็น control (ก่อนเติม IPTG) หลังจากนั้นจะ induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเซลที่ 37 ^{o}C เก็บ 1 ml ของ culture ที่ 1.5, 3, 4.5 ช.ม. และ ข้ามคืน จากนั้น ส่วนของ culture ที่เก็บได้แต่ละช่วงเวลาจะนำมาปั่นเพื่อเก็บ cell pellet ใส่ 1X SDS-sample buffer ต้ม 5 นาทีและนำ ตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (10%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue Lane M, molecular weight marker; lane 1, *E. coli* uninduced extract control (ก่อนเติม IPTG) ; lane 2, *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 1.5 ช.ม. ; lane 3, . *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 3 ช.ม. lane 4. *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce 4.5 ช.ม. lane 5. *E. coli* induced extract เก็บ cell หลัง induce ข้ามคืน ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพคือ molecular weight masses (kDa).

3. **การศึกษาคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักของรีคอมบิแนทท์โปรตีน** metal binding domain

เมื่อนำรีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain protein มาทดสอบการจับกับโลหะหนัก $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$ และ $Pb(NO_2)_3$ โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography ผลพบว่า protein มีการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} และ Co^{2+} โดยพบโปรตีนหลุดออกมาในขั้นตอนสุดท้ายหลังจาก elute ไล่ออกมาจากคอลัมภ์โดยใช้ EDTA (รูปที่ 6A) มีส่วนน้อยที่หลุดออกมาในส่วนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนัก อาจจะเป็นเพราะว่าประสิทธิภาพในการจับกับโลหะหนักไม่ค่อยดีหรืออาจจะเป็นเพราะว่าปริมาณโปรตีนมากเกินไป. ในส่วนของ Fe^{3+}, Mn^{2+} และ Pb^{2+} ไม่พบมีการจับกับ protein โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะหลุดออกมาในขั้นตอนการล้าง column ดังรูปที่ 6B



รูปที่ 6 SDS-PAGE analysis ของ recombinant metal binding protein ในการจับกับโลหะหนัก

Recombinant metal binding protein (ลูกศรชี้) จะถูกทดสอบคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักโดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography และนำตัวอย่างโปรตีนไป run โดยใช้ electrophoresis และใช้ acrylamide gel (15%) ย้อมด้วยสี Coomassie blue A. bound protein;B: unbound protein; Lane 1: molecular weight marker, lane 2: Control (protein ที่ไม่ถูกทดสอบการจับกับโลหะหนัก) , lane 3: $CuCl_2$, lane 4: $ZnCl_2$, lane 5: $CdCl_2$, lane 6: $Pb(NO_2)_3$, lane 7: $FeCl_2$, lane 8: $MgCl_2$, lane 9: $MnCl_2$, lane 10: $CoCl_2$. ค่าที่แสดงทางด้านซ้ายของภาพคือ molecular weight masses (kDa).

4. ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของ recombinant metal binding protein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักเทียบกับ total protein ของ *E. coli* BLR(DE3)

E. coli BLR(DE3) ที่มี pRset ที่มีการแสดงออกของ recombinant metal binding protein จะถูกเลี้ยงใน LB (1000 ml) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol จนกระทั่ง OD600 เท่ากับ 0.5 จากนั้นเซลแบคทีเรียจะถูก induced ให้มีการสร้างโปรตีนโดยการเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM และเลี้ยงเซลต่อเป็นเวลา 3 ช.ม. แบคทีเรียที่ถูก induced จะถูกเก็บและล้างด้วย 20 mM Tris-HCl ที่มี 145 mM NaCl จากนั้นเซลแบคทีเรียจะ resuspended ใน 1 ml 40 mM imidazole, 0.4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mg/ml lysozyme และ 200 µM PMSF. Cell suspensions จะถูกนำไป Cell suspensions จะถูกนำไป เติม DNaseI (1 µg/ml) และ Triton-X (1%) จากนั้น Cell suspensions จะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C เพื่อกำจัด Cell debris และ unbroken cells จากนั้นเก็บ supernatant ไปทดสอบการจับกับโลหะหนักโดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography ปริมาณโปรตีนจะถูกวัดใน supernatant ก่อนการทดสอบการจับกับโลหะหนักและในโปรตีนที่ได้จากช่วงการล้างด้วย EDTA หลังการทดสอบการจับกับโลหะหนักพบว่าเปอร์เซ็นต์ของ recombinant metal binding protein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะ Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2}, Co^{2+} เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ *E. coli* BLR(DE3) เท่ากับ 3.53 %, 4.63 %, 3.86 % และ 3.33 % ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 3)

QR
95
ศ7755
2553

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของ recombinant metal binding protein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนักเทียบกับ total protein ของ *E. coli* BLR(DE3)

Fraction	Total Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Protein (mg)	% total protein
Total protein	0.71	2.82	2	100%
MBP-$CdCl_2$	0.05	1.54	0.077	3.86%
MBP-$CoCl_2$	0.05	1.32	0.066	3.30%
MBP-$CuCl_2$	0.05	1.41	0.07	3.53%
MBP-$ZnCl_2$	0.05	1.85	0.092	4.63%

สำนักหอสมุด
1.5939068
23 ส.ค. 2555

5. สภาวะที่มีผลต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

5.1 ปริมาณโปรตีน

รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain ปริมาณ 25, 50, 100 และ 150 µg จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography พบว่าปริมาณโปรตีนในช่วง 25-150 µg สามารถจับกับโลหะได้หมด

5.2 อุณหภูมิ

รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก CuCl2, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography โดยขณะที่ทดสอบการจับของโปรตีนกับโลหะหนักจะทำการบ่มโปรตีนและโลหะหนักไว้ที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้

5.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

5.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 10 นาที

5.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นคอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักและไม่จับกับโลหะหนักต่อไปผลพบว่าที่อุณภูมิ 37 °C และ 45 °C ไม่มีผลต่อการจับของโปรตีนกับโลหะหนักแต่ที่อุณหภูมิ 65°C ประสิทธิภาพในการจับของโปรตีนกับโลหะ $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$ ลดลง (ดังแสดงในตารางที่ 4)

5.3 pH

รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain จะถูกนำมาทดสอบการจับกับโลหะหนัก $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, โดยวิธี Iminodiacetic acid-agarose (IAA) chromatography โดย

ขณะที่ทดสอบการจับของโปรตีนกับโลหะหนักจะทำการบ่มโปรตีนและโลหะไว้ที่ อุณภูมิห้อง แต่ pH ต่างกันดังนี้

3.1.1 บ่มที่ pH 3 เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2 บ่มที่ pH 5 เป็นเวลา 10 นาที

3.1.3 บ่มที่ pH 7 เป็นเวลา 10 นาที

3.1.4 บ่มที่ pH 9 เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นคอลัมน์จะถูกนำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บโปรตีนที่ไม่มีการจับกับโลหะหนักและไม่จับกับโลหะหนักต่อไปผลพบว่า pH ไม่มีผลต่อการจับของโปรตีนกับโลหะหนัก (ดังแสดงในตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงผลของปริมาณโปรตีนต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

Protein contain	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
150 µg	+	+	+	+
100 µg	+	+	+	+
50 µg	+	+	+	+
25 µg	+	+	+	+

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

ตารางที่ 5 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

Temp.	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
37°C	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+
65°C	-	-	+	-

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

ตารางที่ 6 แสดงผลของ pH ต่อการจับของโลหะหนักกับ recombinant metal binding protein

pH	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
3	+	+	+	+
5	+	+	+	+
7	+	+	+	+
9	+	+	+	+

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

6. ความคงทน (stability) ของ recombinant metal binding protein

ในการศึกษาครั้งนี้รีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain ที่ได้จะถูกนำไปทดสอบในสภาวะต่างๆ ได้แก่

4.1) ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆได้แก่ 25°C , 37 °C , 45°C , 65 °C และ 85 °C เป็นเวลา 10 นาที (thermal stability testing) จากนั้นรีคอมบิแนทท์โปรตีน metal binding domain จากนั้นจึงนำไปใช้ในการศึกษาการจับกับโลหะหนักด้วยวิธี iminodiacetic acid-agarose chromatography ดังข้อ 2.2 ผลพบว่า รีคอมบิโแนทท์ปรตีน metal binding domain ที่อุณหภูมิ 25°C และ 37 °C โปรตีนสามารถจับกับโลหะหนักได้ทั้ง 4 ชนิด ส่วนที่ 45°C พบว่ารีคอมบิแนทท์โปรตีนไม่สามารถจับได้กับ cobolt แต่สามารถจับได้กับ copper , cadmium และ zinc C ส่วนที่ 65°C และ 85°C พบว่ารีคอมบิแนทท์โปรตีนไม่สามารถจับได้กับ cobolt และ cadmium แต่สามารถจับได้กับ copper และ zinc (ดังแสดงในตารางที่ 7) โดยคุณสมบัติของการจับโลหะหนักทั้ง 2 ชนิดยังคงอยู่แม้ treat โปรตีนที่ 85°C เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 7 แสดงผลความคงทนต่ออุณหภูมิ (thermal stability) ของ recombinant metal binding protein

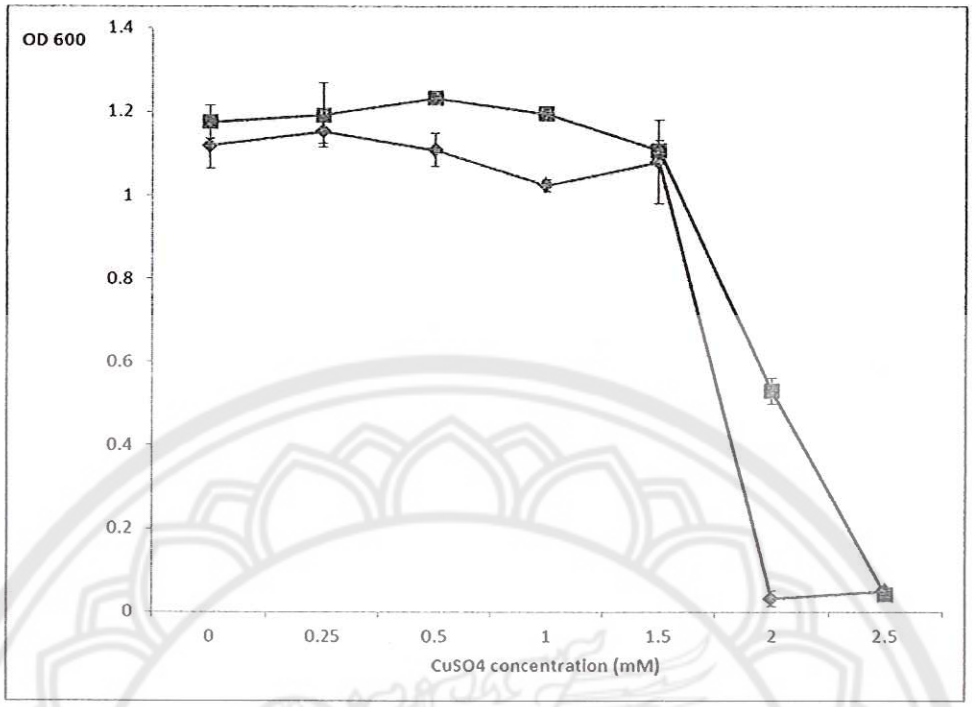
Temp.	$CdCl_2$	$CoCl_2$	$CuCl_2$	$ZnCl_2$
25°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+
45°C	+	-	+	+
65°C	-	-	+	+
85°C	-	-	+	+
85°C, 30 min	-	-	+	+

\+ =พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

\- = ไม่พบโปรตีนมีการจับกับโลหะหนัก

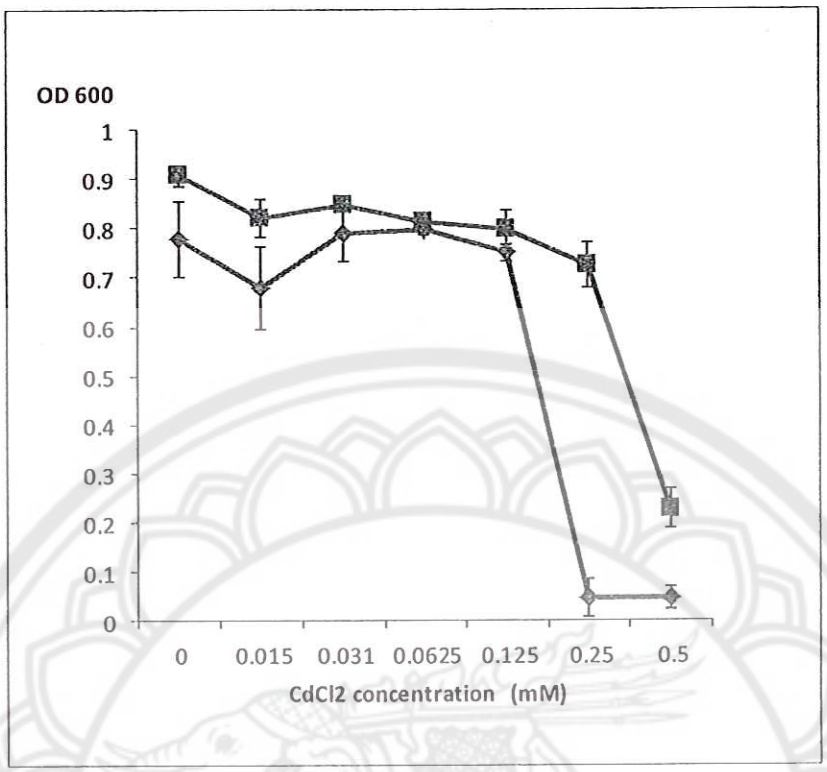
7. Growth curve แสดงการเจริญ ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif ในสภาวะที่มีโลหะหนัก

เพื่อทดสอบว่าการมีโปรตีน heavy metal binding domain แสดงออกในเซลมีผลต่อความทนของเชื้อต่อโลหะหนักทำโดยการศึกษาการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่มี pRset ที่มีการแสดงออกของโปรตีน heavy metal binding domain เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีแต่ pRset (control) ในสภาวะที่มีโลหะหนักชนิด $CuSO_4$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ควบคุมที่มีแต่ pRset เจริญเติบโตช้ากว่า*E. coli* สายพันธุ์ ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif ในสภาวะที่มี $CuSO_4$ ความเข้มข้น 2.5 mM (รูปที่ 7) ในสภาวะที่มี $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM (รูปที่ 8) แต่ไม่พบความแตกต่างของการเจริญของ *E. coli* ในสภาวะที่มีโลหะหนัก $ZnCl_2$ และ $CoCl_2$ (รูปที่ 9 และ 10)



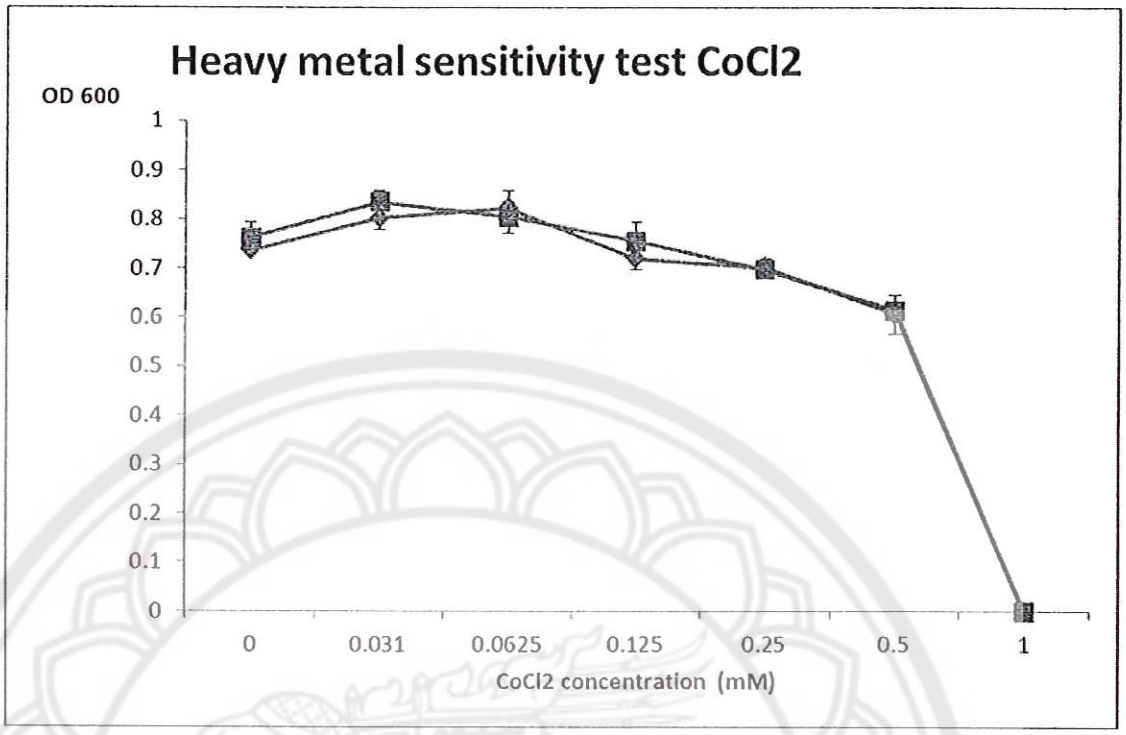
รูปที่ 7 ผลของโลหะหนัก $CuSO_4$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ *pRset* (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และโลหะหนัก $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{o}C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ *spectrophotometer* ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า $\pm$ SD ของสามการทดลอง



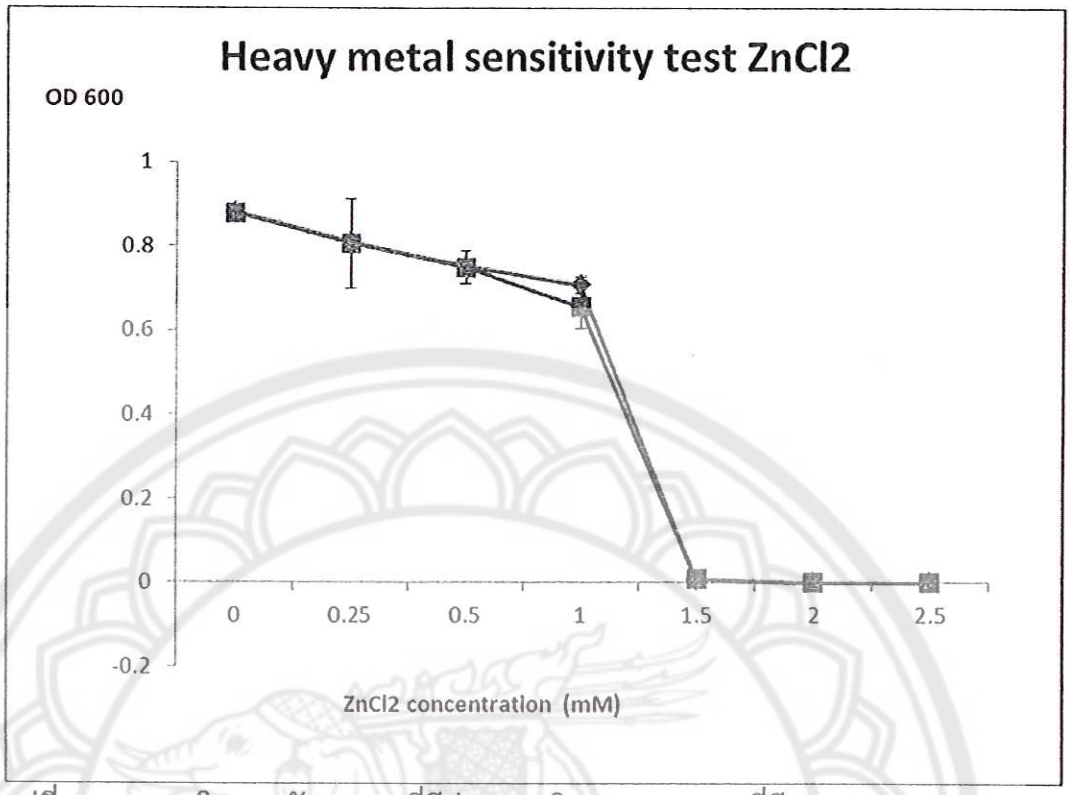
รูปที่ 8 ผลของโลหะหนัก $CdCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth *ที่มี* ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และ $CdCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 37 ^{o}C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า $\pm$ SD ของสามการทดลอง



รูปที่ 9 ผลของโลหะหนัก $CoCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และ $CoCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{o}C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า $\pm$ SD ของสามการทดลอง



รูปที่ 10 ผลของโลหะหนัก $ZnCl_2$ ที่มีต่อการเจริญของ *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif

E. coli ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif (■) และ *E. coli* ควบคุมที่มีแต่ pRset (◆) จะถูกเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ 0.1 mM IPTG และ $ZnCl_2$ ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{o}C ในตู้บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาทีเป็นเวลาข้ามคืนและวัดการเจริญของเชื้อหลังจาก 12 ชั่วโมงโดยใช้ spectrophotometer ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลองและจุดแต่ละจุดที่แสดงถึงค่า ± SD ของสามการทดลอง

อภิปรายผลการวิจัย

1. การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการวิเคราะห์คุณสมบัติในการจับโลหะหนักของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและ crude extract ของ *E. coli*

โปรตีนแต่ละชนิดมีความสามารถในการจับกับโลหะหนักได้แตกต่างกันการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการจับกับโลหะหนักของ MTs ที่มี cysteine-rich motifs สามารถจับกับโลหะ zinc, copper, cadmium และ mercury (Mejáre & Bülow 2001; Das *et al.*, 2006) และ CopA , CopZ และ *mcsA* จาก *S. aureus* และโปรตีน N-WND and N-MNK ในคนที่มี CXXC motif สามารถจับ $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$ และ $CoCl_2$ (Lutsenko *et al.*, 1997; Sitthisak *et al.*, 2007; 2011) เช่นเดียวกับโปรตีนรีคอมบิแนทท์จาก heavy metal binding domain CXXC motif (McsA) ที่สามารถจับได้กับ $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$ และ $CoCl_2$ ปริมาณโปรตีน recombinant ที่มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะ CuCl2, ZnCl2, CdCl2, CoCl2 เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลของ *E. coli* BLR(DE3) เท่ากับ 3.53 %, 4.63 %, 3.86 % และ 3.33 % ตามลำดับ

2. ความคงทนของโปรตีนต่อความร้อน, อุณหภูมิ และ pH ที่มีผลต่อการจับโลหะหนัก

การศึกษาความคงทนของโปรตีนต่อความร้อน ที่มีผลต่อการจับโลหะหนักพบว่าโปรตีนยังมีความสามารถในการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} หลังจากบ่มโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยที่อุณหภูมิ 55 °C จะเป็นอุณหภูมิที่การทำงานของโปรตีนเอ็นไซม์จะเสียไปส่วนที่อุณหภูมิ 85 °C จะเป็นอุณหภูมิที่โครงสร้างสามมิติของโปรตีนถูกทำลายและโปรตีน

เสียสภาพ (Huang, 2010) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นแม้โปรตีน heavy metal binding domain CXXC motif (McsA) จะเสียสภาพก็ไม่มีผลต่อการจับกับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+} ของ heavy metal binding domain CXXC motif (McsA)

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการจับของโปรตีนพบว่าที่อุณหภูมิ 65 °C โปรตีนสามารถจับกับโลหะ Cu^{2+} แต่ไม่สามารถจับกับโลหะ Cd^{2+}, Co^{2+}, และ Zn^{2+} ได้ขณะที่ pH 3-7 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการจับกับโลหะหนักของโปรตีน ผลจากการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Hinc และคณะ (2010) ที่ได้ expressed CotB ที่มี mertal binding domain เป็น poly-his ใน Bacillus subtilis spores พบว่าอุณหภูมิ 25-45 °C และ pH 5-9 ไม่มีผลต่อการจับของโลหะหนักกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน

แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif recombinant protein มีการเพิ่มขึ้นของความทนต่อโลหะหนัก

โปรตีนที่จับกับโลหะหนักทำหน้าที่เป็น heavy metal chaperone ในการจับและลดพิษของโลหะหนักเมื่อตอบสนองต่อ stress response จากโลหะหนัก (Jordan et al., 2001; Ettema et al., 2003) ในการศึกษาความทนต่อโลหะหนักพบว่าแบคทีเรีย *E.coli* ที่มี การ expressed heavy metal binding domain CXXC motif จะมีความทนต่อโลหะคอปเปอร์ และแคดเมียม เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ *E.coli* ที่ไม่มีการ expressed โปรตีน ผลเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้เมื่อมีการสร้าง *E.coli* ที่มียีน *cus* system ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Cu^{2+} ให้มีการแสดงออกที่ผนังเซลของ *E.coli* พบว่า *E.coli* ที่มีการแสดงออกที่ผนังเซลของยีนจาก *cus system* ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Cu^{2+} มีความทนต่อโลหะหนักคอบเปอร์เพิ่มขึ้น (Ravikumar S et al., 2011)

สรุปผลการวิจัยและการนำผลงานวิจัยไปใช้ในอนาคต

การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าโปรตีนที่มี metal binding domain (CxxC motif) มีความสามารถกับการจับโลหะหนักได้หลายชนิดได้แก่ $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$ และ $CoCl_2$ โดยสภาวะการจับโลหะหนักของโปรตีนรีคอมบิแนทท์พบว่าสามารถจับกับโลหะหนักที่ช่วง pH กว้าง(3-9)และจับกับโลหะหนักที่อุณหภูมิที่สูง 65 °C ได้ การจับโลหะหนัก Cu^{2+} และ Zn^{2+}ของโปรตีนรีคอมบิแนทท์ยังทนต่ออุณหภูมิที่สูงถึง 85 °C ได้ 30 นาที แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการ expressed heavy metal binding domain CXXC motif recombinant protein มีการเพิ่มขึ้นของความทนต่อโลหะหนัก $CuSO_4$ และ $CdCl_2$ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนไปใช้ในการศึกษาเพื่อกำจัดโลหะหนักโดยเฉพาะ Cu^{2+} ต่อไปในอนาคต โดยการศึกษาในอนาคตจะมีการศึกษาเปรียบเทียบการนำ whole cell หรือรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปใช้ในการกำจัดโลหะหนัก นอกจากนี้อาจทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติในการจับโลหะหนัก กับ metal binding domain ชนิดอื่น นอกจากนี้อาจมีการสร้างให้มีโปรตีนที่มีการแสดงออกที่ผนังเซลของแบคทีเรียเพื่อช่วยการดูดซับโลหะหนักให้เข้ามาสะสมในเซล (bioadsorbtion) และทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะหนักชนิดต่างๆแล้วสะสมไว้ในเซล (bioaccumulation)

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Arshad M, Silvestre J, Pinelli E, Kallerhoff J, Kaemmerer M, Tarigo A, Shahid M, Guiresse M, Pradere P, Dumat C. (2008). A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium cultivars*. Chemosphere. 71(11), 2187-92.
2. Bae W, Mehra RK, Mulchandani A, Chen W. (2001). Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. Appl Environ Microbiol. 67(11), 5335-38.
3. Battistoni A, Pacello F, Mazzetti AP, Capo C, Kroll JS, Langford PR, Sansone A, Donnarumma G, Valenti P, Rotilio G. (2001). A histidine-rich metal binding domain at the N terminus of Cu,Zn-superoxide dismutases from pathogenic bacteria: a novel strategy for metal chaperoning. J Biol Chem. 276(32), 30315-25.
4. Bonaventura C, Johnson FM. (1997). Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. Environ Health Perspect. 105 Suppl 1, 5-20.
5. Cobbett C, Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu Rev Plant Biol. 53, 159-82.

6. Das K, De Groof A, Jauniaux T, Bouquegneau JM. (2006). Zn, Cu, Cd and Hg binding to metallothioneins in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the southern North Sea. BMC Ecol. 6(1), 2.

7. De J, Ramaiah N, Vardanyan L. (2008). Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. Mar Biotechnol. 10(4), 471-7.

8. Ettema TJ, Huynen MA, de Vos WM, van der Oost J. (2003). TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. Trends Biochem Sci.28(4),170-3.

9. Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I. (1999). Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(11), 5973-77.

10. Glick, BR (2001). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnol Adv. 21(5), 383-93

11. Gupta RK, Dobritsa SV, Stiles CA, Essington ME, Liu Z, Chen CH, Serpersu EH, Mullin BC. (2002). Metallohistins: a new class of plant metal-binding proteins. J Protein Chem. 21(8), 529-36.

12. Haferburg G, Kothe E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. J Basic Microbiol. 47(6), 453-467.

13. Jordan IK, Natale DA, Koonin EV, Galperin MY. (2001). Independent evolution of heavy metal-associated domains in copper chaperones and copper-transporting atpases. J Mol Evol. 53(6), 622-33.

14. Juwa S, Supunpaiboon, W, Sarin C, Krissanakriangkrai O. (2008). Health risk assement from foods consumption in cadmium contaminated area, Mae Sot District, Tak province. The 3th International conference on forensic science and medical science, 2008.

15. Khan ,AG. (2006). Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. J Zhejiang Univ Sci B. 7(7), 503-14.

16. Dolecková P, de Lorenzo LV, Ruml, T. (1999). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. Appl Environ Microbiol. 65(3), 1092-8.

17. Hinc K, Ghandili S, Karbalaee G, Shali A, Noghabi KA, Ricca E, Ahmadian G. (2010). Efficient binding of nickel ions to recombinant *Bacillus subtilis* spores. Research in Microbiology,161(9), 757-64.

18. Huang CC, Su CC, Hsieh J, Tseng C, Lin P, Chang J. (2003). Polypeptides for heavy-metal biosorption: capacity and specificity of two heterogeneous MerP proteins. 3(4), 379-85.

19. Kakudo S, Yoshikawa K, Tamaki M, Nakamura E, Teraoka H. (1992). Secretory expression of a glutamic-acid-specific endopeptidase (SPase)

from *Staphylococcus aureus* ATCC12600 in *Bacillus subtilis*. Apply Microbiology Biotechnology. 38(2), 226-233.

20. Krezel A, Bal W. (1999). Coordination chemistry of glutathione. Acta Biochim Pol. 46(3). 567-80.

21. Lone MI, He ZL, Stoffella PJ, Yang XE. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. J Zhejiang Univ Sci B. 9(3), 210-20.

22. Lutsenko S, Petrukhin K, Cooper MJ, Gilliam CT, Kaplan JH. (1997). N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively *in vivo* and *in vitro* with stoichiometry of one copper per metal binding repeat. Journal of Biological Chemistry 272(30), 18939-44.

23. Mejáre M, Bülow L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. Trends Biotechnol. 19(2), 67-73.

24. Mehra RK, Mulchandani P. (1995). Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. Biochem J. 307 (Pt 3), 697-05.

25. Pandey S, Gupta K, Mukherjee AK. (2007). Impact of cadmium and lead on *Catharanthus roseus* :a phytoremediation study. J Environ Biol. 28(3), 655-62.

26. Penninckx, MJ. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. FEMS Yeast Res. 2(3), 295-05.

27. Pepi M, Volterrani M, Renzi M, Marvasi M, Gasperini S, Franchi E, Focardi SE. (2007). Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. J Appl Microbiol. 103(6), 2299-08.

28. Rani A, Shouche YS, Goel R. (2008). Declination of copper toxicity in pigeon pea and soil system by growth-promoting *Proteus vulgaris* KNP3 strain. Curr Microbiol. 57(1), 78-82.

29. Ravikumar S, Yoo IK, Lee SY, Hong SH. (2011). Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. Appl Biochem Biotechnol. 165, 1674-81

30. Rehman A, Farooq H, Hasnain S. (2008). Biosorption of copper by yeast, *Loddermyces elongisporus*, isolated from industrial effluents: its potential use in wastewater treatment. J Basic Microbiol. 48(3),195-201.

31. Saleem M, Brim H, Hussain S, Arshad M, Leigh MB, Zia-ul-Hassan. (2008). Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. Biotechnol Adv. 26(2),151-161.

32. Sambrook J, Russell D (2001). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

33. Sitthisak S, Knutsson L, Webb JW, Jayaswal RK. (2007). Molecular characterization of the copper transport system in *Staphylococcus aureus*. Microbiology, 153(12), 4274-4283.

34. Sitthisak S, Kitti T, Boonyonying K, Wozniak D, Devreese B, Mongkolsuk S, Jayaswal RK. (2011). McsA and the roles of metal binding motif in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 2011 Nov 29. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02468.x. [Epub ahead of print]

35. Vasák M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. J Trace Elem Med Biol. 19(1),13-17.

36. Wu CH, Wood TK, Mulchandani A, Chen W. (2006). Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. Appl Environ Microbiol. 72(2), 1129-1134.

37. Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. Environ Int. 33(3), 406-413.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส. กมลา บุญยศยิ่ง นายธวัชชัย กิตติ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร นายธนากร วัชระสุภัทร นายวรานันท์ ยศปัญญา นางสาววรรณา กะหวัง นิสิตปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ร่วมดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor R.K. Jayaswal (Illinois State University) ที่ให้ความเอื้อเฟื้อ พลาสมิดในการศึกษา และสุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและภาควิชา จุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เข้าร่วมนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract ในงานนเรศวรวิจัยวันที่ 29-30 ก.ค. 2554 ในหัวข้อเรื่อง "Factor affecting the metal binding affinity of heavy metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein : a potential for bioremediation"
2. เตรียมบทความตีพิมพ์ในวรสารวิชาการระดับนานาชาติ (ไม่มี impact factor) ในหัวข้อเรื่อง "Factor affecting the binding of recombinant heavy metal binding domain (CXXC motifs) protein to heavy metals"
3. ทำการวิจัยต่อเนื่องเกียวกับ การศึกษาการจับและสะสมของโลหะหนักของโปรตีนรีคอมบิแนทท์จากโปรตีนที่จับโลหะหนัก และโปรตีนที่จับโลหะหนักที่มีการแสดงออกบนผนังเซลของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (ทุน window II)

ภาคผนวก (Appendix I)

บทคัดย่อการไปนำเสนอผลงานนเรศวรวิจัยวันที่ 29-30 ก.ค. 2554

Abstract

Factor affecting the metal binding affinity of heavy metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein : a potential for bioremediation

Kamala Boonyodying[1], Thanakorn Watcharasupat[1], Waranan Yotpanya[1], Duangkamol Kunthalert[1] and Sutthirat Sitthisak[1]

[1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; Tel: 0-5596-4712; Fax: 0-5596-4770; E-mail: Kamala.07@hotmail.com

---

Bioremediation is a biological method for removing heavy metals from the environment. Heavy metal binding proteins have been identified in various organisms and have been used to study for bioremediation. CxxC motif is a metal binding domain that found in all living organisms. In this study, we determined the factors involving metal binding activity of the metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein in order to analyze the potential of the recombinant protein for bioremediation. The protein contain metal binding domain (CxxC motif) from *mcsa* gene of *S. aureus* was cloned, expressed and purified. Recombinant protein was tested for metal binding using IAA resin chromatography. The

recombinant protein can bound to $CdCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ and $ZnCl_2$. The expression of metal binding proteins that can bind to $CdCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ and $ZnCl_2$ from the total proteins of *E. coli* (BLR(DE3) are 3.86, 3.3, 3.53 and 4.63%, respectively. Thermal stability of the recombinant protein was tested at 37 ºC, 45 ºC, 65 ºC for 10 minutes and the results shown that the metal binding activity still present after 65 ºC treatment. Temperature that affects the metal binding activity was tested and the results showed that recombinant protein were still bound to $CuCl_2$ at 65 ° C. In conclusion, the results from our study shown that metal binding domain (CxxC motif) recombinant protein can bind effectively to various types of heavy metals and may be used as a potential tool for bioremediation.