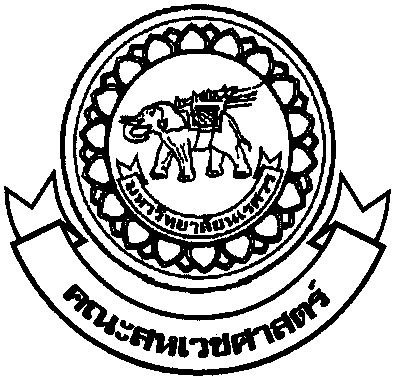


การใช้ *Escherichia coli* ในการสังเคราะห์โปรตีน S1 ของ SARS-CoV-2 ให้หลั่งออกภายนอกเซลล์ ผ่านระบบแฟลกเจลลา

Extracellular protein production for S1 of SARS-CoV-2 protein via *Escherichia coli* flagella system

นายธีรภัทร ฉิมทิม

นางสาวฐิติวรดา ติณะคัด

นางสาวนิภาพร ตะเอกา

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2565

หัวข้อโครงงาน	การใช้ *Escherichia coli* ในการสังเคราะห์โปรตีน S1 ของ SARS-CoV-2 ให้หลั่งออกภายนอกเซลล์ ผ่านระบบแฟลกเจลลา
ชื่อนิสิต	นายธีรภัทร ฉิมทิม นางสาวฐิติวรดา ติณะคัด นางสาวนิภาพร ตะเอกา
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เริงวิทย์ บุญโยม

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เริงวิทย์ บุญโยม)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต คงรส)

หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภวิทู สุขเพ็ง)

คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

หัวข้อโครงงาน	การใช้ *Escherichia coli* ในการสังเคราะห์โปรตีน S1 ของ SARS-CoV-2 ให้หลั่งออกภายนอกเซลล์ ผ่านระบบแฟลกเจลลา
ชื่อนิสิต	นายธีรภัทร ฉิมทิม
	นางสาวฐิติวรดา ติณะคัด
	นางสาวนิภาพร ตะเอกา
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เริงวิทย์ บุญโยม

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ขอรับรองว่านิสิตผ่านการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ โดยได้มีการปรับปรุงแก้ไขรายงานตามข้อเสนอแนะจากคณะกรรมการแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เริงวิทย์ บุญโยม)

ประธานกรรมการ

.....

(ดร.นภาพร อภิรัฐเมธีกุล)

กรรมการ

.....

(ดร.วรวรรษ ส่งแจ้ง)

กรรมการ

กิตติกรรมประกาศ

สำหรับบุคคลแรกที่ขอขอบคุณเป็นอย่างสูงคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เริงวิทย์ บุญโยม อาจารย์ที่ปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีในครั้งนี้ ขอบคุณอาจารย์ที่ให้คำปรึกษา ให้ความรู้ คำแนะนำวิธีการแก้ปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์ ให้ใช้อุปกรณ์และน้ำยาต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้อภัยในข้อผิดพลาดต่าง ๆ ที่ทางคณะวิจัยได้กระทำขึ้น และเป็นเบื้องหลังความสำเร็จของการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ทางคณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ ดร.วรวรรษ ส่งแจ้ง และ ดร.นภาพร อภิรัฐเมธีกุล ที่สละเวลาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงอนุญาตให้ใช้อุปกรณ์และสารสนเทศต่างๆในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่สอนและให้ความรู้ ให้คำแนะนำต่าง ๆ เพื่อใช้ประกอบในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณปฏิพัทธ์ ทินวัง ที่สละเวลาในการให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำงานต่าง ๆ และคอยแลกเปลี่ยนเรียนรู้ในการทำวิทยานิพนธ์

ธีรภัทร ฉิมทิม

ฐิติวรดา ติณะคัด

นิภาพร ตะเอกา

หัวข้อโครงงาน การใช้ *Escherichia coli* ในการสังเคราะห์โปรตีน S1 ของ SARS-CoV-2 ให้หลั่งออกภายนอกเซลล์ ผ่านระบบแฟลกเจลลา

ชื่อนิสิต นายธีรภัทร ฉิมทิม
นางสาวฐิติวรดา ติณะคัด
นางสาวนิภาพร ตะเอกา

สาขาวิชา เทคนิคการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เริงวิทย์ บุญโยม

บทคัดย่อ

การสร้างโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) ส่วนใหญ่นิยมใช้ *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยจะนำชิ้นส่วนยีนที่สนใจมาตัดต่อพันธุ์กรรมดัดแปลงเพื่อเข้าพลาสมิด และจากนั้นก็กระตุ้นให้มีการแสดงออกภายนอกเซลล์ แต่เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้าการสร้างโปรตีนลูกผสมภายในเชื้อ *E. coli* มักจะเกิดการรวมตัวกันของโปรตีนทำให้ตกตะกอนภายในเซลล์ (Inclusion bodies) ดังนั้นจึงไม่สามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ ตามที่กล่าวมา ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 ที่มีการเคลื่อนที่สูงสุด เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการสร้างโปรตีนลูกผสมให้มีการแสดงออกภายนอกเซลล์ผ่านทางระบบ Flagella type 3 secretion system (T3SS) ซึ่งระบบนี้มีความจำเป็นในการสร้าง Flagellar และขนส่งโปรตีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเชื่อมยีน *S1* ที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีน S1 ของเชื้อ SARS-CoV-2 โดยจะอยู่ในพลาสมิด pBADS1 ซึ่ง พลาสมิดนี้จะประกอบได้ด้วยยีน *S1* และ Flagellin (*flic*) ที่มีส่วนของ Secretion signal อยู่ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26-47 ทางด้าน N-terminal โดยผลการทดลองการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเซลล์และการหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำการอ่านผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blotting จะแสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสม S1 สามารถหลั่งออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านทาง T3SS ได้ แต่มีขนาดของโปรตีนน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่โปรตีนลูกผสมดังกล่าวถูกเอนไซม์ protease ย่อย ในส่วนของโปรตีน FliC หรือ โปรตีน Strep tag ทำให้เห็นโปรตีนมีขนาดเล็กลง

คำสำคัญ โปรตีนลูกผสม, fT3SS, *E. coli*, S1, FliC

Project Title Extracellular protein production for S1 of SARS-CoV-2 protein via *Escherichia coli* flagella system

By Mr.Teerapat Chimthim
Ms.Titivarada Tinakad
Ms.Nipaporn Ta-aeka

Program title Medical Technology

Advisor Asst.prof. Rerngwit Boonyom, PhD

Abstract

Recombinant protein production is biotechnological process. It's generating a specific protein by inserting an interesting gene into an expression plasmid. *Escherichia coli* (*E. coli)* is widely used for expressing recombinant protein. From previous study showed that the recombinant proteins production often leads to occur inclusion body of recombinant protein inside the host cell. For this reason, many works developed a novel system for extracellular protein production. In this study, we used *E. coli* K-12 that have a high motility as a host for secreting recombinant protein into culture media *via* the Flagella type 3 secretion system (fT3SS). This system is necessary for flagellar assembly and secreting bacterial protein outside the bacterial cell. The pBADS1 plasmid contains the *S1* gene and gene coding for secretion signal of flagellin, residual 26 to 47. Results of this study showed that intracellular and extracellular FliC-S1-Strep tag protein. S1 recombinant protein was secreted into culture media by fT3SS. But the size of protein is smaller than expected which may be due to the protease enzyme digestion in the FliC or Strep tag, causing the protein to secrete smaller.

Keywords Recombinant protein, fT3SS, *E. coli*, S1, FliC

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
2	ทบทวนวรรณกรรม	3
	SARS-CoV-2	3
	ที่มาและความสำคัญของ SARS-CoV-2	3
	โครงสร้าง SARS-CoV-2	3
	การสร้างโปรตีนลูกผสม	4
	Escherichia coli	5
	- ลักษณะทั่วไปของ *Escherichia coli*	5
	- ลักษณะทั่วไปของแฟลกเจลลา	6
	- โครงสร้างหลักของแฟลกเจลลา	7
	- การสร้างแฟลกเจลลา	8
	- Flagellar type III secretion system (fT3SS)	9
	- Flagellin (FliC)	11
	การเกิด Inclusion bodies ใน Recombinant *Escherichia coli*	12
3	วิธีดำเนินการวิจัย	14
	ระเบียบวิธีวิจัย	14
	รูปแบบการวิจัย	14
	เครื่องมือในการวิจัย	15
	วิธีการทดลอง	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	- การคัดเลือกเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Semi solid plate agar	17
	- การคัดเลือกพลาสมิดที่แสดงออกเป็นโปรตีน FliC-S1-Strep tag	17
	- การตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ *E. coli* K-12	19
	- การทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *E. coli*	20
4	ผลการวิจัย	22
	การเคลื่อนที่ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Semi solid plate agar	22
	การนำพลาสมิด pBADS1 เข้าสู่เชื้อ *E. coli* K-12	23
	การทำ Colony PCR	23
	การตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ *E. coli* K-12	24
	การทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* K-12	25
5	อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	27
6	สรุปผลการวิจัย	31
เอกสารอ้างอิง		32
ภาคผนวก		35
ประวัติผู้วิจัย		40

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ลักษณะโปรตีนตรงส่วนหนาม (spike protein) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2	4
แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบบนโปรตีนหนาม	4
แสดงลักษณะของของเชื้อ *E. coli* ภายใต้กล้องจจุลทรรศน์ (A,B) Transmission microscope (C,D) Scanning microscope	6
แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆของแฟลกเจลลา	6
แสดงขั้นตอนการสร้างแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย (A-G) ขั้นตอนการสร้างส่วนของ Basal body (H-N) ขั้นตอนการสร้างส่วนของ Hook (O-P) ขั้นตอนการสร้างส่วนของ Filament และ (Q-R) แสดงภาพของ Flagella หลังจากมีสร้างทุกส่วนเสร็จสมบูรณ์	8
แสดงโครงสร้าง flagellar type III secretion system	10
แสดงกระบวนการขนส่งโปรตีนผ่านทาง Flagellar type III secretion system	10
แสดง Recombinant pectatelyase C ที่เกิดเป็น inclusion bodies ใน *E.coli*	12
แสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	14
แสดงส่วนประกอบพื้นฐานของพลาสมิด pBADS1 ที่ใช้ในการวิจัย	15
แสดงการเคลื่อนที่ของ E. coli สายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ (A) *E. coli* K-12 (B) *E. coli* BL21 (C) *E. coli* Nissle (D) *E. coli* DH5-α และ (E) positive control คือ *Salmonella spp*.	22
แสดงโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทำ heat-shock transformation โดย (A) plate 1 และ (B) plate 2	23
แสดงพลาสมิด pBADS1 ที่มีชิ้นส่วนยีน *flic-s1-Strep tag* ขนาด 1,700 bp	24
แสดงขนาดชิ้นส่วนโปรตีน FliC-S1-Strep tag จากพลาสมิด pBADS1 และ PCR product ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 1 และ 2	24
แสดงการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ในเชื้อ *E. coli* K-12 เมื่อนำมาทำ western blot	25
แสดงผลการตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ และการตรวจสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag มายังอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี western blot	26

สัญลักษณ์และคำย่อ

m	milli
μm	Micrometer
kDa	kilo Dalton
mM	Millimolar
M	Molar
DNA	Deoxyribonucleic acid
bp	Base pair
LB broth	Luria-Bertani broth
LBA broth	Luria-Bertani broth with ampicillin
LB agar	Luria-Bertani agar
LBA agar	Luria-Bertani agar with ampicillin
rpm	Round per minute
μl	Microliter
μg	Microgram
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TSB-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TCA	Trichloroacetic acid
TAE	Tris-acetate-EDTA
Amp	Ampicillin
OD	Optical density or absorbance
Ori	Origin of replication
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine
PCR	Polymerase chain reaction

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การสร้างโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เกิดจากการนำชิ้นส่วนพันธุกรรมที่สนใจมาตัดต่อดัดแปลงเข้ากับพลาสมิด และทำการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกในส่วนของโปรตีนภายในเซลล์เจ้าบ้าน โดยส่วนใหญ่เซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้คือ *Escherichia coli (E. coli)* แต่เนื่องจากการสร้างโปรตีนไว้ภายในเซลล์ (intracellular protein) ส่งผลให้มีโอกาสที่โปรตีนลูกผสมบางชนิดเกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนภายในเซลล์ หรือที่เรียกว่า inclusion bodies จึงมีการพัฒนาการสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular protein)

การสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ เป็นการสร้างโปรตีนภายในแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยให้มีการหลั่งในส่วนของโปรตีนที่สนใจออกมานอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการสร้างโปรตีนในลักษณะนี้สามารถทำได้ในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli (E. coli)* โดยเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีระบบการขนส่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านทาง Flagella Type III secretion system (fT3SS) ที่เป็นส่วนประกอบในการสร้างแฟลกเจลลา โดยอาศัยพลังงานจาก Proton Motive Force (PMF) ในการขนส่งโปรตีน Flagellin (FliC) เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของ flagella ที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์และหลั่งออกนอกเซลล์ผ่านทางระบบ T3SS ซึ่งประกอบไปด้วย 4 domain ได้แก่ D0, D1, D2 และ D3 ในเชื้อ *E. coli* โดยโปรตีน FliC จะถูกขนส่งออกสู่นอกเซลล์ผ่านทาง T3SS โดยมีส่วนของ export signal เป็นส่วนสำคัญในการขนส่ง FliC ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทางคณะผู้จัดทำจึงมีความสนใจที่จะนำ FliC มาสร้างเป็นโปรตีนลูกผสม S1 protein เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของปุ่มยื่นออกมาจากชั้นเปลือก หรือที่เรียกว่า สไปค์ (spike) ของเชื้อ SARS-CoV-2 ซึ่งมีความสำคัญในการใช้เกาะกับตัวจับ (receptor) บนผิวเซลล์และเป็นแอนติเจนหลักในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แต่เนื่องจากการสร้างโปรตีนลูกผสม S1 ไว้ภายในเซลล์ โดยใช้เชื้อ *E. coli* นั้นทำให้เกิด inclusion bodies ภายในเซลล์ ส่งผลให้การสกัดเพื่อให้ได้โปรตีน S1 ที่บริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก

ดังที่กล่าวมา ทางคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคการสร้างโปรตีนลูกผสม S1 ให้มีการขนส่งโปรตีนลูกผสมออกสู่นอกเซลล์ผ่านทาง Type III secretion system (T3SS) โดยอาศัยพลาสมิด pBAD24 ที่มีส่วนประกอบของยีน *fliC* และชิ้นส่วนของยีน *s1* เป็นส่วนประกอบภายในพลาสมิด

จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli* โดยทำการตรวจสอบการหลั่งโปรตีนที่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot

วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

เพื่อศึกษาการสร้างโปรตีนลูกผสม S1 ของเชื้อ SARS-CoV-2 ให้มีการหลั่งออกมานอกเซลล์ผ่านทาง Flagella Type III secretion system (fT3SS) ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตการวิจัย

นำ recombinant plasmid ที่มียีน *s1* ที่เชื่อมอยู่กับยีน *fliC* และนำไปเข้าเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ จากนั้นกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสม S1 ให้มีการหลั่งออกมานอกเซลล์โดยอาศัยโปรตีน FliC แล้วทำการทดสอบการหลั่งของโปรตีน ที่มีการหลั่งออกมานอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านทางระบบ fT3SS

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

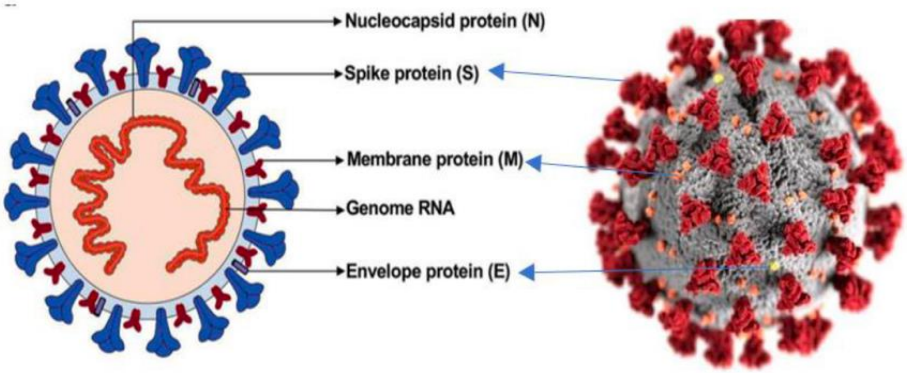
1. SARS-CoV-2

1.1 ที่มาและความสำคัญของ SARS-CoV-2

การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019 หรือ COVID-19) เกิดขึ้นครั้งแรกวันที่ 30 ธันวาคม พ.ศ. 2562 มีรายงานกลุ่มผู้ป่วยด้วยโรคปอดอักเสบไม่ทราบสาเหตุเกิดขึ้นที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน ต่อมาในวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2563 ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (Chinese Center for Disease Control and Prevention; China CDC) ออกมาประกาศอย่างเป็นทางการว่าสาเหตุของโรคปอดอักเสบดังกล่าวนั้น เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาชนิดใหม่ ที่ไม่ใช่ไวรัสซาร์ส-โควี (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus; SARS-CoV) ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงหรือโรคซาร์ส และไม่ใช่ไวรัสเมอร์ส-โควี (Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus; MERS-CoV) ซึ่งทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลางหรือโรคเมอร์ส จึงตั้งชื่อไวรัสชนิดนี้ในตอนแรกว่า 2019-Novel Corona Virus (2019-nCoV) และในวันที่ 11 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ทาง The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้ออกมาประกาศชื่อใหม่ของไวรัสว่าไวรัสซาร์ส-โควี-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2; SARS-CoV-2) และตั้งชื่อโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวว่า โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโรคโควิด-19 (Coronavirus disease 2019; COVID-19) การระบาดของโรคโควิด-19 ได้กระจายเป็นวงกว้างอย่างรวดเร็ว จากเริ่มแรกมีการระบาดแค่ในสาธารณรัฐประชาชนจีนเพียงประเทศเดียว ต่อมาได้กระจายไปยังประเทศและภูมิภาคอื่นๆ ทั่วโลก โดยในวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2563 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้โรคโควิด-19 เป็นโรคระบาดใหญ่ทั่วโลก (pandemic) ในปัจจุบันยังคงมีผู้ติดเชื้อ ผู้ป่วย และผู้เสียชีวิตด้วยโรคโควิด-19 เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง (1)

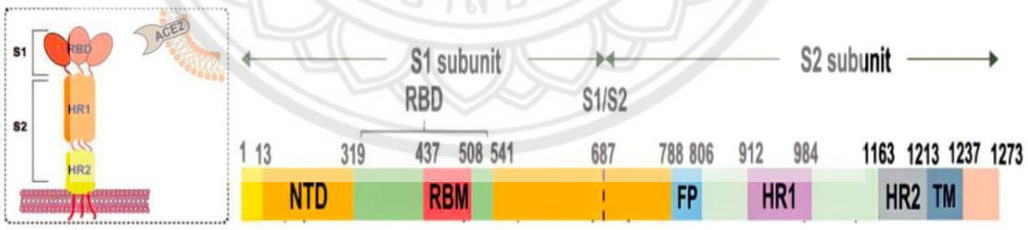
1.2 โครงสร้าง SARS-CoV-2

ไวรัสโคโรนา (SARS-CoV-2) เป็นไวรัสที่มีปลอกหุ้ม (envelope) ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างโปรตีนหลัก 4 กลุ่ม คือโปรตีนหนาม (Spike glycoprotein: S) โปรตีนปลอกหุ้ม (Envelope glycoprotein : E) โปรตีน เยื่อหุ้มไวรัส (Membrane glycoprotein: M) โปรตีนบนสายพันธุกรรม (Nucleo-capsid protein: N) และโปรตีนที่ไม่เกี่ยวกับโครงสร้าง (non-structural proteins: NSPs) อีกหลายชนิด ดังแสดงในภาพ 1 (2)



ภาพ 1 ลักษณะโปรตีนตรงส่วนหนาม (spike protein) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (2)

โปรตีนหนาม (S-glycoprotein) มีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อของไวรัสโควิด-19 เป็นส่วนที่ไวรัสใช้จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ในตำแหน่งที่เรียกว่า Angiotensin-Converting Enzyme 2 receptor (ACE2 receptor) ซึ่งพบมากที่เยื่อบุทางเดินหายใจ ก่อนเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนแล้วแพร่ระบาดออกไป โปรตีนหนามประกอบด้วย 2 ส่วน (subunit) คือ S1 subunit และ S2 subunit โดย S1 subunit จะมีส่วนที่เรียกว่า receptor-binding domain (RBD) ที่ใช้ที่ยึดจับกับ ACE2 receptor ส่วน S2 subunit จะทำหน้าที่ช่วยในการรวมตัว (fusion) ของเยื่อหุ้มไวรัสเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ ดังแสดงในภาพ 2 (2)



ภาพ 2 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบบนโปรตีนหนาม (2)

2. การสร้างโปรตีนลูกผสม

การสร้างโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) คือการนำยีนที่สนใจมาตัดต่อดัดแปลงเข้ากับเวกเตอร์ แล้วนำเข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมใช้คือเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทราบลำดับพันธุกรรมครบถ้วนและสมบูรณ์ จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายและนิยมใช้ในกาแสดงออกและสร้างโปรตีนลูกผสม เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจและกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน โดยมีการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ (Intracellular) จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตก

ด้วยวิธีต่างๆ เช่นการใช้คลื่นเสียง (sonication) หรือการใช้สารละลายด่างในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (alkaline lysis) เพื่อให้ได้โปรตีนที่สนใจออกมา ก่อนจะนำไปทำให้บริสุทธิ์นั้นทำได้ยากและมีความซับซ้อน เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากโปรตีน เอนไซม์และสารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์เจ้าบ้าน และมีโอกาสที่โปรตีนบางชนิดจะรวมตัวกันเกิดการตกตะกอนภายในเซลล์ (inclusion bodies) และนอกจากนี้โปรตีนลูกผสมที่สร้างขึ้นอาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ protease ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่สมบูรณ์ (3)

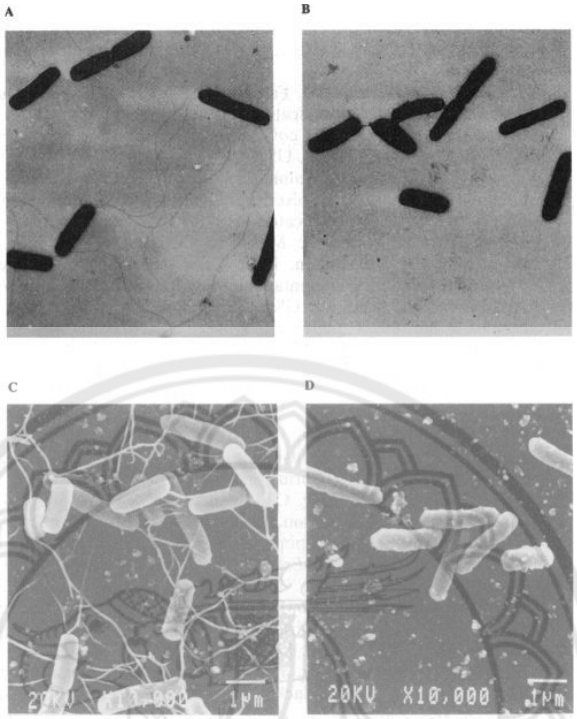
การสร้างโปรตีนแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular) มีระบบการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ 6 ระบบ ซึ่งมีความแตกต่างกันในส่วนองค์ประกอบของระบบ โดยระบบการ หลั่งโปรตีน type V จะประกอบไปด้วย 1 หรือ 2 องค์ประกอบเท่านั้น ในขณะที่ระบบอื่น (type II, III, IV) ประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด และได้เคยมีการนำระบบการหลั่งโปรตีนแบบต่างๆ มาใช้ในการสร้างโปรตีนลูกผสมที่ต้องการจะศึกษาอย่างแพร่หลาย (4) ซึ่งงานวิจัยนี้จะเน้นไปในส่วนของระบบการหลั่งโปรตีน type III (T3SS) โดยอาศัยกลไกการหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์เพื่อใช้ในการสร้างแฟลกเจลลา นำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์โดยนำส่วนของ signal sequence (export signal) ซึ่งอยู่ในสายของแฟลกเจลลิน (FliC) มาต่อเข้ากับโปรตีนที่สนใจ จากนั้นกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์โดยไม่มีการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน การสร้างโปรตีนลูกผสมแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์จึงมีประโยชน์มากกว่าเมื่อเทียบกับแบบที่สร้างไว้ภายในเซลล์ และจากที่กล่าวมาข้างต้นการสร้างโปรตีนแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์จึงสามารถหลีกเลี่ยงไม่ให้มีการปนเปื้อนและถูกทำลายจาก โปรตีนภายในเซลล์ lipopolysaccharide กรดนิวคลิอิก หรือเอนไซม์ชนิดต่างๆได้ ทำให้โปรตีนที่ได้ออกมานั้นมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตรวจพบได้ง่าย และง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ จึงทำให้นำการสร้างโปรตีนแบบให้หลั่งออกมานอกเซลล์มาใช้ซึ่งมีข้อดีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ แบบที่สร้างไว้ภายในเซลล์มาใช้แทน (5)

3. *Escherichia coli*

3.1 ลักษณะทั่วไปของ *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (rod shape) มีขนาดตั้งแต่ 1.1-1.5 x 2.0 - 6.0 µm สายพันธุ์ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว เชื้อไม่มีการสร้างสปอร์ (non-spore forming) สามารถเจริญได้ทั้งในสถาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ปกติสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ช่วงอุณหภูมิ 7-46 องศาเซลเซียส และมีค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4.4-10 อีกทั้งเชื้อมีแคปซูลบาง ๆ หุ้มอยู่รอบตัวทำให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้า

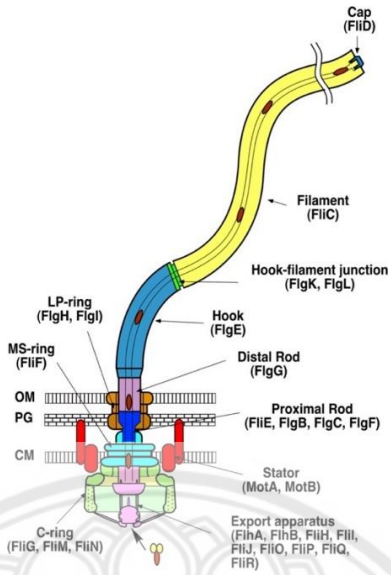
และฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้นานหลายสัปดาห์ แต่ถูกทำลายเมื่อต้มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดังแสดงในภาพ 3



ภาพ 3 แสดงลักษณะของของเชื้อ *E. coli* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(A,B) Transmission microscope (C,D) Scanning microscope (6)

3.2 ลักษณะทั่วไปของแฟลกเจลลา

แฟลกเจลลา (flagella) เป็นอวัยวะหนึ่งของแบคทีเรียที่ใช้สำหรับเคลื่อนที่ โดยมีส่วนประกอบของโปรตีนต่าง ๆ มากมาย โดยการเคลื่อนที่ของแฟลกเจลลานั้น เกิดจากแรงการหมุนของ flagella motor จึงทำให้แบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ โดยโครงสร้างหลักของแฟลกเจลลาแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ basal body, hook และ filament ดังแสดงในภาพ 4 (7)



ภาพ 4 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆของแฟลกเจลลา (8)

3.3 โครงสร้างหลักของแฟลกเจลลา

1. Basal body เป็นส่วนที่ติดอยู่กับ cell membrane และ cytoplasmic membrane มีลักษณะเป็นท่อหรือทรงกระบอก ประกอบไปด้วย L ring, P ring, C ring และ MS ring (9) โดย C ring คือ ส่วนของมอเตอร์ที่ติดอยู่กับไซโตพลาสซึมของ MS ring และ MS ring จะมีโปรตีนชื่อว่า Mot Complexes อยู่ล้อมรอบ และในส่วนตรงกลางของ MS ring ยังมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ type III flagella protein export apparatus หรือ T3SS apparatus ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการขนส่งโปรตีน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของแฟลกเจลลา (10)

2. Hook มีลักษณะโครงสร้างเป็นท่อสั้นโค้ง มีโปรตีน FlgE ประมาณ 120 หน่วย เป็นส่วนประกอบ (11) โดยตำแหน่งของ hook จะอยู่ระหว่าง basal body และ filament มีหน้าที่เป็นข้อต่อสำหรับส่งแรงมอเตอร์จาก basal body ไปยัง filament ทำให้เกิดการหมุนของแฟลกเจลลาส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ (12)

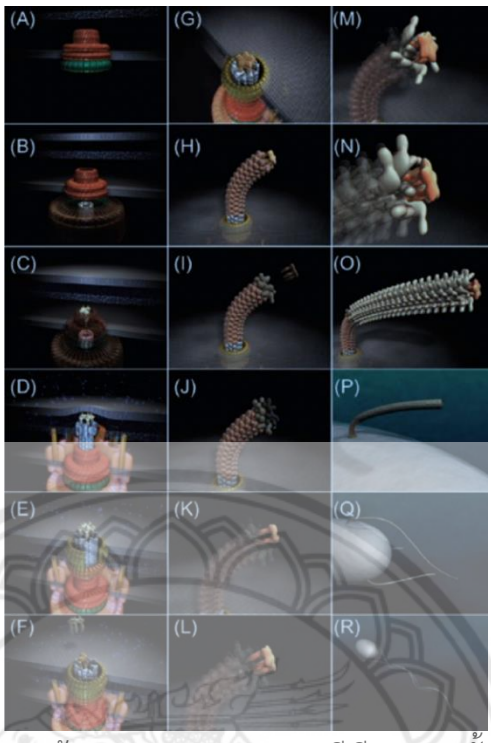
3. Filament มีโครงสร้างลักษณะเป็นท่อเกลียวที่ถูกเชื่อมต่อกับ basal body โดยมี hook เป็นตัวเชื่อม filament มีโปรตีน flagellin (FliC) ประมาณ 30,000 โมเลกุลเป็นส่วนประกอบ สามารถยาวได้ถึง 15 μm มีหน้าที่ช่วยในการเปลี่ยนทิศทางการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยทำงานร่วมกันกับสายโปรตีนที่มีชื่อว่า dynein (9)

3.4 การสร้างแฟลกเจลลา

การสร้างแฟลกเจลลามีขั้นตอนการสร้าง ดังแสดงในภาพ 5 โดยเริ่มจากการสร้าง MS ring ในผนังชั้นในขึ้นมาก่อนจากนั้นจะตามด้วยการรวมตัวของ C ring protein ได้แก่ FliG ,FliM และ FliN โดยจะรวมตัวกันเป็น C ring อยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งติดกับส่วนของ MS ring เมื่อมีการสร้าง C ring เสร็จแล้ว mot protein MotA และ MotB จะเข้ามารวมตัวกันในผนังชั้นใน โดย MotA และ MotB ประกอบกันเป็น stator complex ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เป็นเส้นทางการไหลผ่านของโปรตอน (13) และ MotB ในส่วนของ C-terminal จะเป็นตำแหน่งที่ติดกับชั้นของ peptidoglycan (14)

หลังจากมีการสร้าง C ring จะมีการรวมตัวกันของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ flagella type III secretion system (fT3SS) ได้แก่ FliA, FliB, FliH, FliI, FliJ, FliO, FliQ, และ FliR ซึ่งจะรวมตัวกันอยู่ที่ basal body ภายในช่องตรงกลางของ MS ring (15) จากนั้น fT3SS จะอาศัยพลัง งานจาก proton motive force (PMF) เพื่อใช้ในการขนส่งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่างๆของแฟลกเจลลา (15) จากนั้นจะมีการขนส่งส่วนประกอบของ rod ได้แก่ FliE, FlgB, FlgC, FlgF และ FlgG ผ่านทาง type III secretion apparatus และรวมตัวกันเป็น rod (17) เมื่อสร้าง rod เสร็จจะมีการสร้าง P-ring และ L-ring ภายในผนังชั้นนอกโดยอาศัยโครงสร้างของ rod

หลังจากที่มีการสร้าง rod และ ring ต่างๆเสร็จแล้ว ต่อมาจะมีการสร้าง hook (FlgE) โดยความยาวของ hook จะถูกควบคุมโดย FliK (18) จากนั้นจะมีการสร้าง hook-associated protein ได้แก่ FlgK, FlgL, และ FliD (19) และในขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างแฟลกเจลลาจะมีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ flagella gene จากนั้นแฟลกเจลลินจะถูกส่งผ่านทาง fT3SS ไปในส่วนปลายของสายแฟลกเจลลา โดยมี cap (FliD) ซึ่งเป็นโครงสร้างรูปร่างห้าเหลี่ยม ประกอบด้วยฐาน 1 ฐาน และขา 5 ขา จะช่วยในการจัดเรียง FliC เพื่อสร้างเป็น filament โดยใน 1 filament จะประกอบไปด้วย flagellin ประมาณ 20,000-30,000 subunit (10,20)



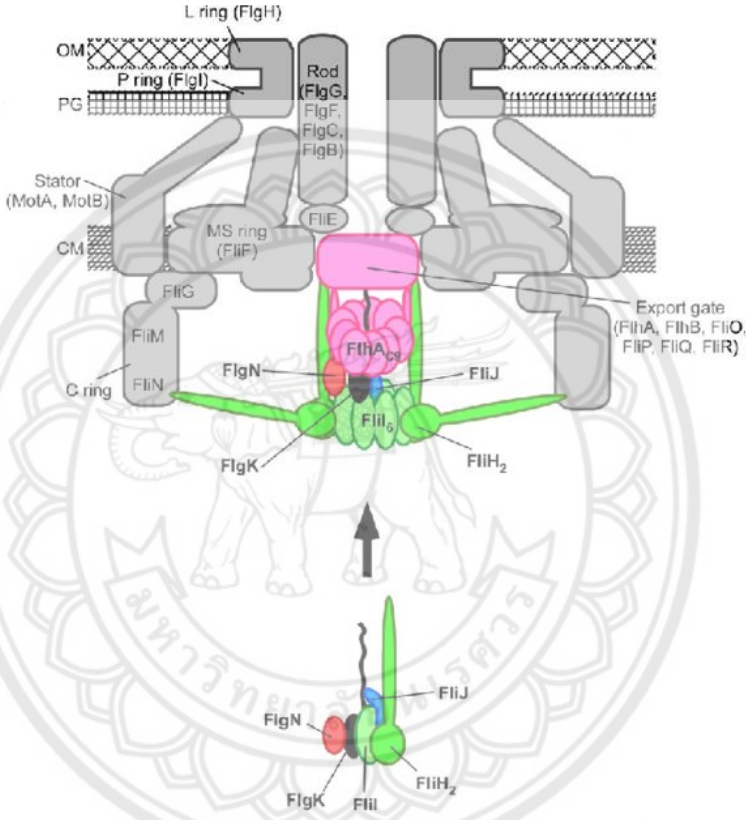
ภาพ 5 แสดงขั้นตอนการสร้างแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย (A-G) ขั้นตอนการสร้างส่วนของ Basal body (H-N) ขั้นตอนการสร้างส่วนของ Hook (O-P) ขั้นตอนการสร้างส่วนของ Filament และ(Q-R) แสดงภาพของ Flagella หลังจากมีสร้างทุกส่วนเสร็จสมบูรณ์ (21)

3.5 Flagellar type III secretion system (fT3SS)

Flagellar type III secretion system หรือ fT3SS คือกลไกที่ใช้ในการขนส่งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ rod, hook และ filament เพื่อใช้ในการสร้างแฟลกเจลลา fT3SS จะอยู่ภายใน MS ring ของ basal body มีโปรตีน 9 ชนิด เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ FliH,FliI, FliJ, FlhA, FlhB,FliO, FliP, FliQ และ FliR โดยโปรตีนที่จัดเป็น membrane proteins มี 6 ชนิด ได้แก่ FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ และ FliR ส่วนโปรตีนอีก 3 ชนิด ได้แก่ FliH, FliI, FliJ จัดเป็น soluble protein (10)

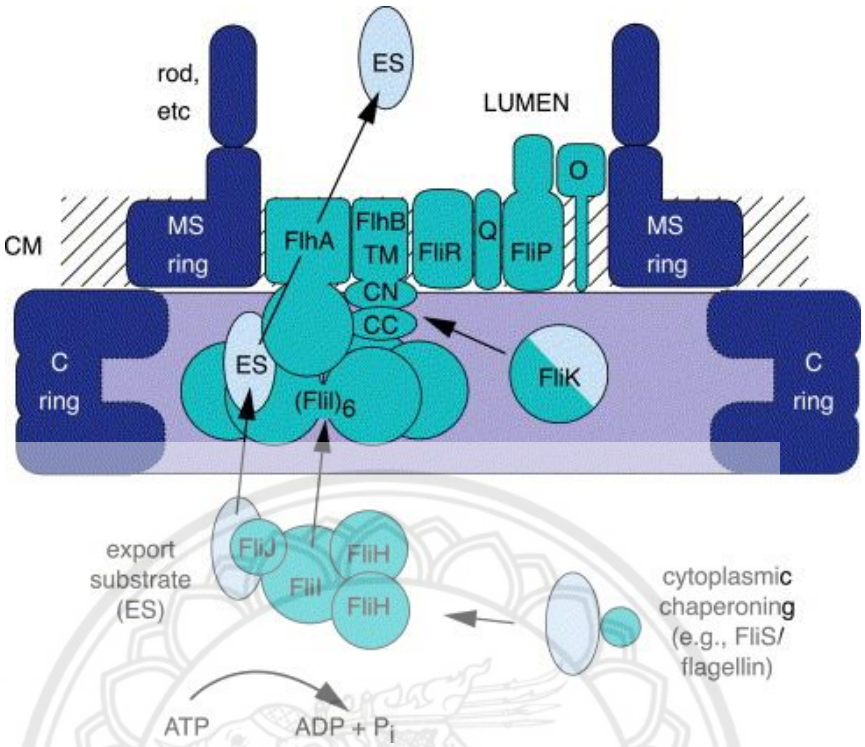
soluble protein (FliH, FliI, FliJ) จัดเป็นส่วนที่ช่วยในการขนส่งโปรตีนและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และยังมีส่วนช่วยในการเพิ่ม ATPase activity หรือ การขนส่งออกนอกเซลล์ผ่าน export apparatus โดย FliI คือ ATPase ใช้ในการย่อยสลาย ATP ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง ATP ซึ่งรูปแบบการทำงานของ FliI จะเป็น homohexamer ส่งผลให้ FliI สามารถให้พลังงานแก่ flagellar export system โดยจะมี FliH จะเป็นตัวยึด FliI hexamer ให้ไปยัง export gate และจะมี FliJ เป็นองค์ประกอบสำคัญของ FliI-FliJ-FliH ATPase complex ซึ่งถ้าหากขาด FliJ ไป จะส่งผลให้แฟลกเจลลาไม่เกิดการเคลื่อนที่ (22)

membrane proteins FihA, FihB, FliO, FliP, FliQ, และ FliR เป็นโครงสร้างโปรตีนขนาดเล็ก จะรวมตัวกันเป็น export ate complex ที่บริเวณตรงกลางของ fT3SS apparatus เพื่อขนส่ง substrate ไปยังโครงสร้างของแฟลกเจลลาที่กำลังเติบโต โดยอาศัย Proton Motive Force (PMF) เป็นแหล่งพลังงานในการขนส่ง และส่วน FihA ,FihB เป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ จะยื่นออกไปในไซโตพลาสซึม ส่วนนี้จะทำปฏิกิริยากับ FliH, FliI, FliJ นอกจากนั้น FliB ยังมีหน้าที่ในการเปิดปิดช่องที่ใช้ในการส่งออกโปรตีนต่างๆ ผ่านทาง fT3SS apparatus อีกด้วย (23)



ภาพ 6 แสดงโครงสร้าง flagellar type III secretion system (10)

นอกจากนี้ในส่วนของกระบวนการขนส่งโปรตีนผ่านทาง fT3SS ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่า FliH-FliI complex จะมีบทบาทในการจับกับโปรตีนที่ส่งออก จากนั้นนำโปรตีนมายังส่วนของ export apparatus และมีการสลาย ATP เพื่อให้ได้พลังงานมากระตุ้น และอาศัยพลังงานจาก proton motive force (PMF) ในการส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ไซโตพลาสซึมทาง fT3SS ดังแสดงในภาพ 7 (23)



ภาพ 7 แสดงกระบวนการขนส่งโปรตีนผ่านทาง Flagellar type lll secretion system (23)

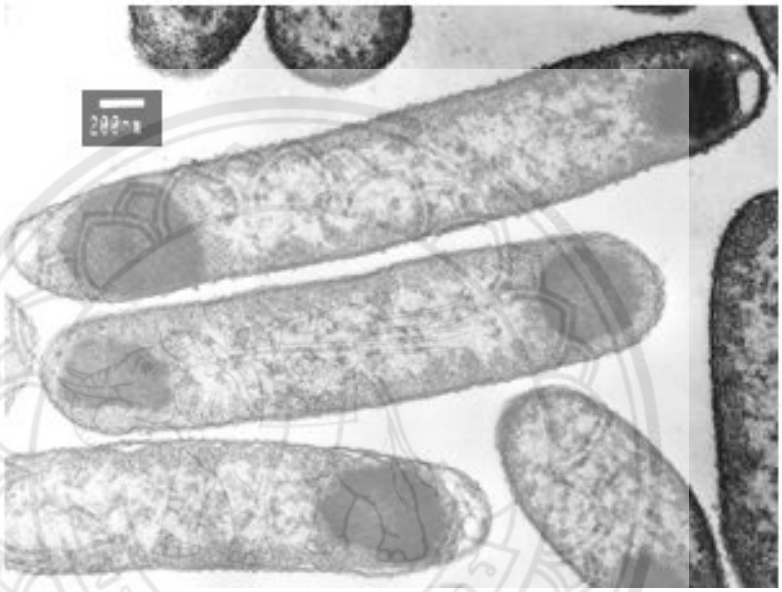
3.6 Flagellin (FliC)

แฟลกเจลลิน หรือ FliC เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของฟิลาเมนท์ ประกอบไปด้วย 4 domain ได้แก่ D0, D1, D2 และ D3 โดยที่ D0 เป็น domain ที่อยู่ภายในสุด ติดกับส่วนที่เป็นช่องว่างของฟิลาเมนท์ ส่วน D3 เป็น domain ที่อยู่นอกที่อยู่สุดของฟิลาเมนท์ ในส่วนของ D0 และ D1 จะประกอบกันอยู่ในรูปของ α-helical ตรงแกนกลางของฟิลาเมนท์ ในส่วนของ D2 และ D3 จะประกอบกันอยู่ในรูปของ β-sheet ตรงผิวด้านนอกของฟิลาเมนท์ ดังแสดงในภาพ 7 (24)

FliC ในเชื้อ *E. coli* เป็นโปรตีนที่มีขนาด 51,2950 Da หรือ 51 kDa ซึ่งสร้างจากยีน *fliC* ประกอบด้วย 498 กรดอะมิโน โดยส่วนของทางด้าน N-terminal มี 190 กรดอะมิโนและในส่วนของ C-terminal มีกรดอะมิโนถึง 100 กรดอะมิโน โดยจะถูกขนส่งออกสู่นอกเซลล์ผ่านทาง fT3SS และมีส่วนของ export signal เป็นส่วนสำคัญในการขนส่ง FliC ออกสู่นอกเซลล์ ใน *E. coli* จะพบว่าส่วนของ export signal นั้นอยู่ตรงกรดอะมิโนต่ำแหน่งที่ 26-47 ทางด้าน N-terminal ของ FliC (24)

4.การเกิด Inclusion bodies ใน recombinant *Escherichia coli*

Inclusion bodies ที่พบในไซโตพลาสซึม ส่วนมากจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-1.5 μm ซึ่ง inclusion bodies ที่มีขนาดใหญ่จะสามารถเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และแสดงลักษณะไฟบรินเจนภายใต้แสงโพลาไรซ์ โดยทั่วไปแล้วจะพบ inclusion bodies 1 อันต่อเซลล์ โดย inclusion bodies นั้นจะไม่ยึดติดกับผนังเซลล์ มีรูปร่างลักษณะที่ไม่เหมือนกับโครงสร้างอื่น ๆภายในเซลล์ และมีลักษณะแน่นทึบมากกว่า (25) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพ 8 Recombinant pectatelyase C ที่เกิดเป็น inclusion bodies ใน *E.coli*

จากการศึกษาของ Kane JF และ Hartley DL พบว่า inclusion bodies เกิดจากความผิดปกติในการม้วนพับของโปรตีน (misfolded protein) (26) นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งที่ทำให้เกิด Inclusion bodies คือ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell physiology) และลักษณะทางกายภาพของโปรตีนลูกผสม และแม้ว่าจะเป็นโปรตีนลูกผสมชนิดเดียวกัน แต่ถ้าอยู่ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิที่แตกต่างกัน โปรตีนลูกผสมนั้นก็อาจจะเกิดเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำหรือเกิดเป็น inclusion bodies ได้

กลไกการทำงานของเซลล์เจ้าบ้านจะขึ้นอยู่กับการปรับเปลี่ยนสภาวะของเซลล์เจ้าบ้านขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงหรือขึ้นกับการใช้เซลล์เจ้าบ้านที่มีการกลายพันธุ์ ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวจะส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน การย่อยสลาย (degradation) หรือการม้วนพับ (folding) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญเติบโตคือตัวแปรที่สำคัญ ในเซลล์เจ้าบ้านบางสายพันธุ์ทำการเพาะเลี้ยงที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อาจทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่เป็น inclusion bodies และเมื่อลดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลงจะเกิดการสร้างเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (27)

เมื่อปี 2008 Margreiter G. และคณะได้มีการรายงานเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ใน *E.coli* K-12 โดยเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะเป็น inclusion bodies โดยขนาดจะเพิ่มขึ้น 200 nm หลังจากเวลาผ่านไป 25 ชั่วโมงและอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อขนาดของ inclusion bodies คือ ความเข้มข้นของตัวกระตุ้น โดยถ้าลดความเข้มข้นของตัวกระตุ้นลง จะทำให้ขนาดของ inclusion bodies ลดลงด้วย (28, 29)

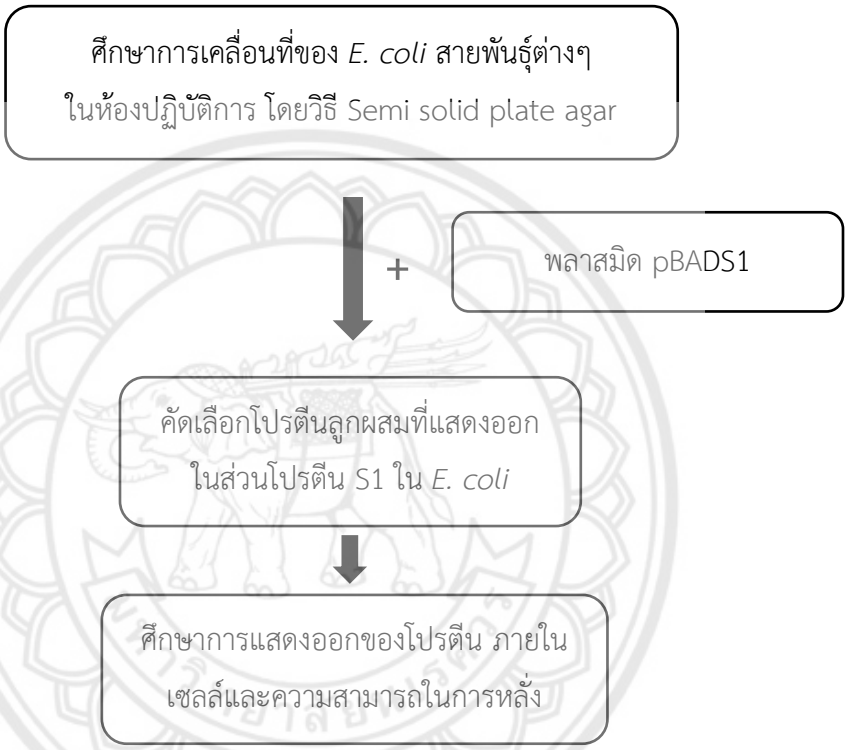
และในปี พ.ศ. 2557 ชยธร ศรีสวัสดิ์ และ มนวรรณ อินทรสูต (30) ได้ทำการสร้างโปรตีนลูกผสม LipL41 ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ โดยการนำยีน *lipl41* ของเชื้อ *Leptospira spp.* มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และนำยีนที่ได้มาทำการตัดต่อยีนเข้ากับพลาสมิด pBNFRB ซึ่งภายในพลาสมิดประกอบไปด้วยยีน *flic* ยีนสร้างโปรตีน GST และยีนดื้อยา ampicillin นำพลาสมิดที่มีการเชื่อมต่อเข้ากับยีน lipl41 เข้าไปยังเชื้อ *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด จากนั้นทำการคัดเลือกและสกัดพลาสมิดออกมา และนำพลาสมิดที่ได้ไปใส่ในเชื้อ *S. Typhimurium* ทำการตรวจสอบการหลั่งโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยระบบการขนส่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านทาง Type III secretion system (T3SS) ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot ได้ผลว่า การวิจัยนี้ไม่สามารถที่จะสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยโปรตีน FliC ในการชักนำโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ เนื่องจากโปรตีนที่สร้างขึ้นเกิดเป็น inclusion bodies ภายในเซลล์

ดังที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่สร้างโปรตีนลูกผสม S1 ให้หลั่งออกมานอกเซลล์ เนื่องมาจากในส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนของ Export signal ของโปรตีน FliC ซึ่งจะถูกจดจำโดยส่วนของ T3SS apparatus ทำให้มีการสร้างและหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ผ่านทาง fT3SS ของเชื้อ E. coli มาในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนการทำให้เซลล์แตก โดยนำพลาสมิด pBADS1 ที่มีส่วนประกอบของ *s1* และ *flic* เพื่อสังเกตการชักนำของ FliC จะสามารถชักนำโปรตีน S1 ออกนอกมาภายนอกเซลล์โดยผ่านแฟลกเจลลาของเชื้อ *E. coli* ซึ่งหากสามารถทำได้ เพื่อให้ได้โปรตีน S1 ที่มีโครงสร้างที่สมบูรณ์ออกมาภายนอกเซลล์และสามารถนำโปรตีนลูกผสมที่ได้ไปประยุกต์ใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย



ภาพ 9 แสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

2. รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยและพัฒนา

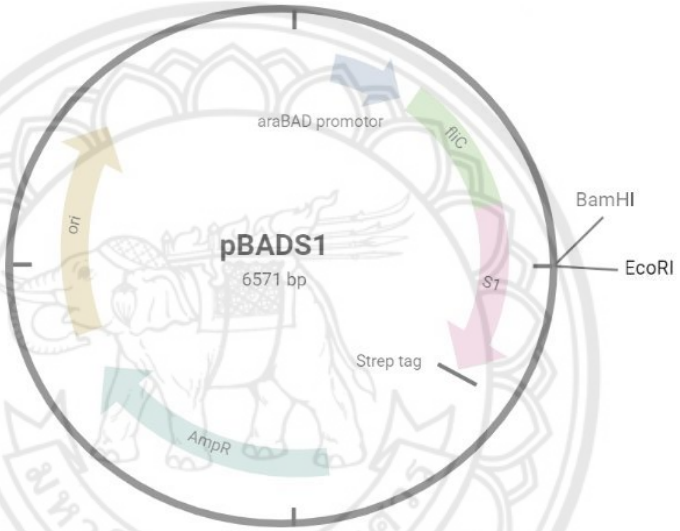
3. สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Nissle , BL21 ,DH5-α และ K-12
2. เชื้อ *Salmonella Typhimurium* สายพันธุ์ SL1344

4. พลาสมิดและ Primers

พลาสมิด

pBADS1 เป็น recombinant plasmid ประกอบด้วย 1) araBAD promotor 2) ยีน *flic* ที่มีส่วน export signal 3) ยีน *s1* เป็นยีนที่มีการสร้าง S1 โปรตีนที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Flic-S1-Strep tag 4) ยีนดื้อยา Ampicillin (AmpR gene) เพื่อใช้ในการตรวจสอบว่ามีพลาสมิดมีการเข้าสู่เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ และ 5) ori ตำแหน่งที่เริ่มมีการเพิ่มจำนวนของพลาสมิด ซึ่งมีการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วยเอมไซม์ arabinose โดยมีรายละเอียดของพลาสมิด ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพ 10 แสดงส่วนประกอบพื้นฐานของพลาสมิด pBADS1 ที่ใช้ในการวิจัย

Primers

- Colony checking primers

Primers	Oligonucleotide sequence
pJBT F	GTTTTTTTGGGCTAGCAGGAG
S1 ch R	CTCTGTATGGTTGGTAACCAACACC

5.เครื่องมือในการวิจัย

5.1 ครุภัณฑ์

1. เครื่อง orbital incubator Shaker รุ่น GYROMAX 737 บริษัท Amerex Instruments .TM_ ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. เครื่อง Centrifuge บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมัน

3. เครื่อง PCR รุ่น Major Cycler บริษัท Major Science ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. เครื่อง Electrophoresis (Power supply) รุ่น EC250-90 บริษัท E-C Apparatus ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. เครื่อง Electrophoresis (Power supply) รุ่น POWER PAC 300 บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. เครื่อง Electroporation system รุ่น ECM 399 บริษัท BTX HARVARD APPARATUS ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. ชุดแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าชนิดแนวตั้ง รุ่น Mini-PROTEAN 3 cell บริษัท BIO-RAD

8. ชุด Electroblotter รุ่น V10-EB10 บริษัท SCIE-PLAS ประเทศสหราชอาณาจักร

9. เครื่อง Mini Horizontal Gel Electrophoresis System บริษัท Major Science ประเทศสหรัฐอเมริก

10. เครื่อง ChemiDoc TM XRS+ System บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

11. เครื่อง Gel documentation รุ่น Platinum D55 บริษัท UVITEC Cambridge ประเทศสหราชอาณาจักร

12. เครื่อง Vortex Mixer รุ่น Vortex genie-2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

13. เครื่อง High-speed Mini centrifuge รุ่น Microspin 12 บริษัท Biosan ประเทศลัตเวีย

14. เครื่อง Thermo-Block บริษัท Biosan ประเทศลัตเวีย

15. เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็วสูงแบบตั้งโต๊ะ รุ่น 2070 ยี่ห้อ Hettich บริษัท เบค ไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์จำกัด

5.2 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องแก้วพื้นฐาน

2. Sterile tips

3. Auto pipette

4. Hockey stick

5. Loop

6. จานเพาะเชื้อ

7. Test tube, Collectin tube, Falcon tube และ Eppendorf tube

5.3 สารเคมี

1. Polyacrylamide

2. 1X Tris-glycine buffer

3. T4 DNA ligase และ buffer บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศ สหรัฐอเมริกา

4. Skim milk บริษัท Hardydiagnostics ประเทศ สหรัฐอเมริกา

5. BamH I restriction enzyme บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศ สหรัฐอเมริกา

6. EcoR I restriction enzyme บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. ประเทศ สหรัฐอเมริก

7. Ampicillin บริษัท Bio Basic inc. ประเทศแคนาดา

8. Ammonium persulfate บริษัท Darmstadt ประเทศเยอรมัน

9. Glucose

10. Arabinose

11. ชุดสกัดพลาสมิด Mini Plus Plasmid DNA Extraction System บริษัท Viogene ประเทศไต้หวัน

12. ชุดสกัด PCR product จากเจล HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit บริษัท RBC Bioscience ประเทศไต้หวัน

6.วิธีการทดลอง

6.1) การคัดเลือกเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Semi solid plate agar

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Nissle, BL21, DH5-α และ K-12 ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ มาทำการทดสอบเพื่อดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ ด้วยวิธี Semi-solid plate agar โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB plate จากนั้นนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าว มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จึงทำการดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ *E. coli*

6.2) การคัดเลือกพลาสมิดที่แสดงออกเป็นโปรตีน FliC-S1-Strep tag

6.2.1) การเตรียม competent cell จากเชื้อ *E. coli*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 0.5 ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 50 ml บ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาข้ามคืน จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 10 ml และนำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติม 10% TB buffer ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 100 µl และเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

6.2.2) การสกัดพลาสมิด pBADS1 จากเชื้อ *E. coli* โดยใช้ The HiYield™ Plasmid Mini Kit

เลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีน FliC-S1-Strep tag และผ่านการบ่มเพาะเป็นเวลาข้ามคืนใน LB broth ปริมาตร 10 ml มาทำการเติม PD1 buffer ปริมาตร 400 µl จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 rpm เวลา 15 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม PD2 buffer ปริมาตร 400 µl ผสมแบบ invert 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเวลา 2 นาที เติม PD3 buffer ปริมาตร 600 µl ผสมแบบ invert 10 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที นำ PD column ใส่ลงใน collection tube ดูดส่วนใสจาก microcentrifuge tube ใส่ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านใน collection tube ทิ้ง เติม W1 buffer ปริมาตร 400 µl ลงใน PD column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านใน collection tube ทิ้ง เติม Wash buffer (ethanol) ปริมาตร 700 µl นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านใน collection tube ทิ้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วน PD column ใส่ลงใน microcentrifuge tube เติม Elution buffer (distilled water) ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จึงได้พลาสมิดที่ต้องการสำหรับนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli*

6.2.3) การนำพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli*

ผสม competent cell จากที่เตรียมไว้ 100 µl กับ พลาสมิด pBADS1 ปริมาตร 5 µl ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำมาใส่ลงใน water bath ทันทีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ LB broth ปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด competent cell ปริมาตร 200 µl ลงใน LB agar plate ที่มีส่วนผสมของ 100 µg/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

6.2.4) Colony PCR

เลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบน LBA agar plate ที่ผสมร่วมกับยา Ampicillin แล้วเขี่ยโคโลนีใส่ PCR tube แล้วเติม master mix โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วนของ S1 และ Strep

จากนั้นนำไปทำ PCR จำนวน 20 รอบ นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis และสังเกต band ที่เกิดขึ้น ถ้าหากมี band เกิดขึ้น ให้ทำการเขี่ยโคโลนีนั้นมาเลี้ยงต่อใน LB broth ที่ผสมด้วยยา Ampicillin และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ด้วย 1 mM Arabinose ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 1 mM Glucose ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 30 นาที แล้วนำไปทำ SDS-PAGE ต่อไป

6.3) การตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ *E. coli* K-12

6.3.1) SDS-PAGE

เตรียม Polyacrylamide gel ได้แก่ separating และ stacking gel จากนั้นนำไปประกบที่เครื่อง run electrophoresis ใส่ 1X SDS running buffer แล้วนำเซลล์ที่ได้หลังจากการกระตุ้นด้วย Arabinose และ Glucose มาผสมกับ 2X sample loading dye buffer ปริมาตร 100 µl แล้วนำไปต้มที่ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วที่ 5,000 rpm 15 นาที จากนั้นนำ cell lysate ส่วนใสด้านบนใส่ลงในแต่ละหลุม ใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 180 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการย้อมเจลด้วยสี Coomassie brilliant blue แล้วทำการ Destining จนกว่าเจลจะเห็นเป็นสีใส นำเจลไปถ่ายรูปที่เครื่อง ChemiDoc

6.3.2) Western blot

นำเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE มาทำการลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ให้เท่ากับขนาดของเจล โดยจุ่ม membrane ลงใน methanol เปิด gel holder cassette จุ่ม fiber pad กับ Towbin transfer Buffer และวางให้อยู่ตรงกลางของ black slide นำ filter paper 1 แผ่น จุ่มลงใน Towbin transfer Buffer นำเจลวางบน filter paper แล้ววาง membrane ลงบนเจล นำ filter paper อีก 1 แผ่น วางบน membrane จากนั้นปิด Gel holder cassette วางลงใน tank แล้วเติม Towbin transfer Buffer ลงใน tank นำ tank ใส่ Styrofoam box ที่ประกบด้วยน้ำแข็ง แล้วรันด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น membrane ที่มีโปรตีนซึ่งถูกย้ายมาจากเจล มาบ่มด้วย 5% skim milk ที่ละลายใน TBS-T ซึ่งใช้เป็น blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องโดยการเขย่าเบาๆ 40 นาที จากนั้นเติม anti-rabbit strep tag IgG ปริมาตร 1 µl ลงใน 5% skim milk ที่ละลายใน TBS-T บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างออกด้วย TBS-T 10 นาที 3 ครั้ง ทำการเติม anti-rabbit IgG conjugated with HRP ปริมาตร 1 µl จากนั้นล้างออกด้วย TBS-T 10 นาที 3 ครั้ง และอ่านผลด้วยเครื่อง ChemiDoc

6.4) การทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *E. coli*

6.4.1) การเตรียม competent cell จากเชื้อ *E. coli*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K-12 ปริมาตร 0.5 ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 50 ml มี *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด pBADS1 เป็น Negative control บ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาข้ามคืน จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 10 ml และนำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติม 10% TB buffer ลงไป ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 100 µl และเก็บที่ -30 องศาเซลเซียส

6.4.2) การนำพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli*

ผสม competent cell จากที่เตรียมไว้ 100 µl กับ พลาสมิด pBAD-S1-Strep tag ปริมาตร 5 µl ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำมาใส่ลงใน water bath ทันทีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ LB broth ปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วนำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด competent cell ปริมาตร 200 µl ลงใน LB agar plate ที่มีส่วนผสมของ 100 µg/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาข้ามคืน

6.4.3) การตรวจสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ของ *E. coli* ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลของ Western Blotting เป็น positive มาเพาะเลี้ยงใน LBA broth ปริมาตร 3 ml มี *E. coli* ที่ไม่มีพลาสมิด pBADS1 เป็น Negative control บ่มเพาะไว้ใน shaking incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อที่ได้ปริมาตร 0.1 ml เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LBA broth 2 ml ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการวัดค่า OD ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน โดยเติม 1 mM Arabinose บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเติม 1 mM Glucose บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

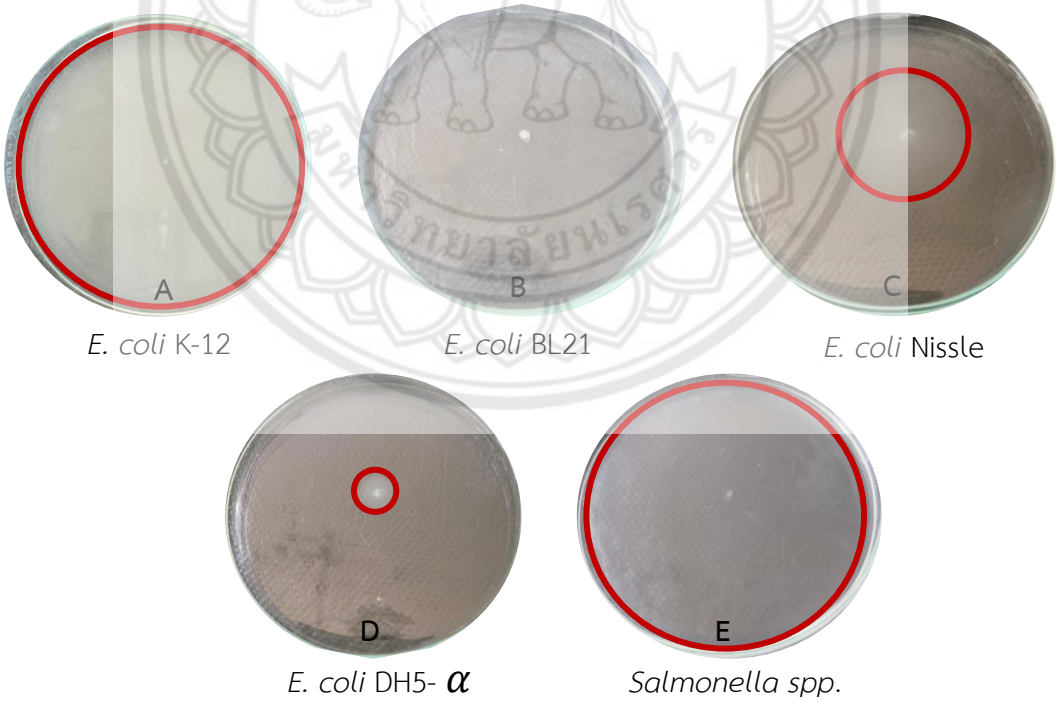
ระยะเวลา 30 นาที ในเครื่อง shaking incubator จากนั้นทำแบ่งเชื้อจากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตรละ 100 µl แล้วนำส่วนที่เหลือมาทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกรองส่วนใสด้วย Filter ขนาด 0.22 µm และนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% Ammonium sulfate ทำการเขย่าสารและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาทีให้ตกตะกอน นำไปแช่ตู้เย็น ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนของเชื้อด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ml และนำมาแบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ปริมาตร 1 ml เติมลงไปและนำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบเวลา นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง ทำการเติม Acetone 200 µl แล้วนำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้ง ระยะเวลา 2 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทิ้งและปล่อยให้แห้ง จากนั้นละลายใน Tris pH 8.8 ปริมาตร 50 µl ผสมกับ 2x SDS loading dye ปริมาตร 50 µl จากนั้นทำการตรวจสอบโปรตีนที่หลั่งออกด้วย SDS-PAGE และ Western Blotting โดยการใช้ anti-rabbit strep tag IgG เพื่อติดตามโปรตีนที่สร้างขึ้น ร่วมกับ goat anti-rabbit IgG conjugated with HRP และสังเกต band ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเคลื่อนที่ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Semi solid plate agar

จากการนำ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีในห้องปฏิบัติการคือ K-12, BL21, Nissle และ DH5-α โดยมี positive control คือเชื้อ *Salmonella spp.* มาทดสอบดูการเคลื่อนที่ด้วยวิธี semi solid plate agar นำโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมา stab หรือจิ้มลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°c ข้ามคืน ผลการทดสอบพบว่า *E. coli* K-12 มีการเคลื่อนที่สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ BL21, Nissle, DH5-α โดยมี positive control คือ *Salmonella spp.* เพื่อควบคุมผลการทดสอบ ดังแสดงในภาพ 11 ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือก *E. coli* K-12 ในการทดลองต่อไป



E. coli K-12 *E. coli* BL21 *E. coli* Nissle

E. coli DH5- α *Salmonella spp.*

ภาพ 11 แสดงการเคลื่อนที่ของ E. coli สายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ (A) *E. coli* K-12 (B) *E. coli* BL21 (C) *E. coli* Nissle (D) *E. coli* DH5-α และ (E) positive control คือ *Salmonella spp.*

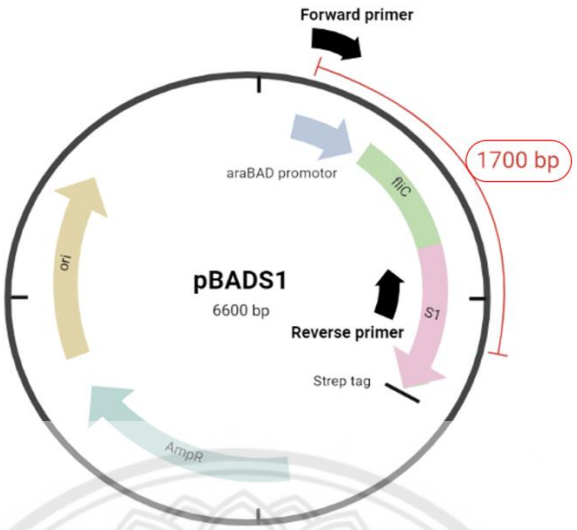
2. การนำพลาสมิด pBADS1 เข้าสู่เชื้อ *E. coli* K-12

จากการนำพลาสมิด pBADS1 เข้าสู่เชื้อ *E. coli* K-12 โดยอาศัยหลักการ Heat-shock transformation และนำไปเพาะเลี้ยงบน LBA plate พบว่ามีโคโลนีขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 2 plate โดย plate A พบ 18 โคลโลนี และ plate B พบ 11 โคโลนี จากนั้นทำการเลือกโคโลนี plate ละ 1 โคโลนี ดังแสดงในภาพ 12 เพื่อตรวจสอบผลการมีพลาสมิดอยู่ภายในเชื้อ *E. coli* K-12 ด้วยเทคนิค colony PCR

ภาพ 12 แสดงโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทำ heat-shock transformation โดย (A) plate 1 และ (B) plate 2

3. การทำ Colony PCR

จากการเลือกโคโลนีของ *E. coli* K-12 มาจำนวน 2 โคโลนี ที่ผ่านกระบวนการ Transformation เพื่อทำการตรวจสอบโคโลนีด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วนของ araBAD promotor และ S1 จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *flic-s1-Strep tag* ของเชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 1 และ 2 ที่เพาะเลี้ยงบน LBA plate เทียบกับเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBADS1 ซึ่งมียีน *flic-s1-Strep tag* ขนาด 1,700 bp ดังแสดงในภาพ 13A เป็น positive control หลังจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* โคโลนี 1 และ 2 มีขนาดประมาณ 1,700 bp ดังแสดงในภาพ 13B



ภาพ 13A แสดงพลาสมิด pBADS1 ที่มีชิ้นส่วนยีน *flic-s1-Strep tag* ขนาด 1,700 bp

ภาพ 13B แสดงขนาดชิ้นส่วนโปรตีน FliC-S1-Strep tag จากพลาสมิด pBADS1 และ PCR product ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 1 และ 2

โดย	Lane M คือ	DNA marker
	Lane P คือ	*E. coli* ที่มีพลาสมิด pBADS1
	Lane 1 คือ	เชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 1
	Lane 2 คือ	เชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 2

4. การตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ *E. coli* K-12

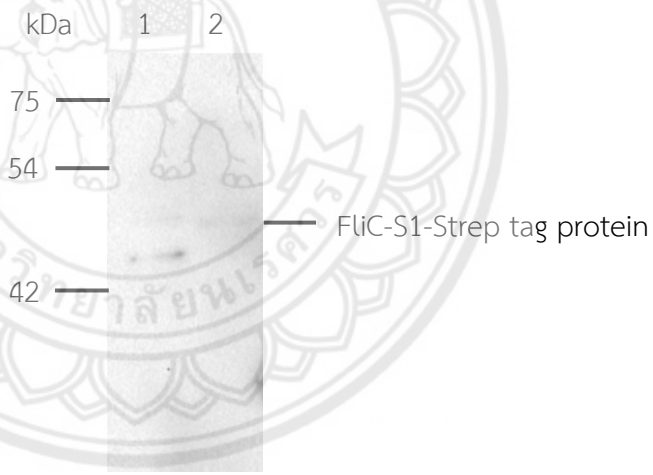
จากการนำเชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 1 และ 2 ที่มีพลาสมิด pBADS1 มาเพาะเลี้ยงใน LBA broth และทำการทดสอบโดยกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ด้วย 1mM arabinose เป็นเวลา 30 นาที และยับยั้งการสร้างโปรตีนด้วย 1mM glucose เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blotting ผลการทดสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ด้วยวิธี Western Blotting โดยมี Anti-rabbit Strep tag IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนStrep tag พบว่าโปรตีน FliC-S1-Strep tag ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* K-12 โคโลนี 1 และ 2 มีขนาดประมาณ 48 kDa แต่จากการคำนวณโปรตีน FliC-S1-Strep tag พบว่ามีขนาด 59 kDa

ภาพ 14 แสดงการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ในเชื้อ *E. coli* K-12 ด้วยวิธี western Blotting

โดย lane 1 คือ โปรตีน FliC-S1-Strep tag จาก *E. coli* K-12 โคโลนี 1
lane 2 คือ โปรตีน FliC-S1-Strep tag จาก *E. coli* K-12 โคโลนี 2

5. การทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* K-12

จากการนำ *E. coli* K-12 ที่มีพลาสมิด pBADS1 มา subculture ข้ามคืน จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงใน LBA broth แล้วทำการกระตุ้นให้มีการแสดงออกเป็นโปรตีน FliC-S1-Strep tag โดยใช้ 1mM arabinose เป็นเวลา 30 นาที และยับยั้งการสร้างโปรตีนด้วย 1mM glucose เป็นเวลา 30 นาที และนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกแยกออกปั่นตกตะกอนเชื้อ *E. coli* K-12 จากนั้นทำการกรองส่วนใสด้วย Filter ขนาด 0.22 μm และนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% Ammonium sulfate แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blotting ผลการตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ *E. coli* K-12 และตรวจสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag มายังอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี western Blotting โดยมี Anti-rabbit Strep tag IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีน Strep tag พบว่าโปรตีน FliC-S1-Strep tag ที่มีการแสดงออกภายในเซลล์มีแถบขึ้น 2 แถบ โดยแถบที่ 1 มีขนาด 48 kDa แถบที่ 2 มีขนาด 45 kDa และการหลั่งโปรตีนมายังอาหารเลี้ยงเชื้อมีแถบขึ้น 1 แถบ มีขนาด 48 kDa แต่จากการคำนวณโปรตีน FliC-S1-Strep tag พบว่ามีขนาด 59 kDa



ภาพ 15 แสดงผลการตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ และการตรวจสอบ การหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag มายังอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี Western Blotting

โดย Lane 1 คือ โปรตีนจากเชื้อ *E. coli* K-12
Lane 2 คือ โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อจากเชื้อ *E. coli* K-12

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดพลาสมิด pBADS1 จากเชื้อ *E. coli* ซึ่งพลาสมิด pBADS1 มีส่วนประกอบของยีนหลัก ได้แก่ ยีน *flic* เป็นส่วนที่มี Export signal, ยีน *S1* เป็นส่วนของ Spike ของเชื้อ SARS-CoV-2 และยีน *Strep tag* ซึ่งถือว่าเป็นตัวที่ประกอบมาในส่วนของพลาสมิด pBAD24 เมื่อทำการสกัดพลาสมิด pBADS1 แล้ว ทำการนำพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *E. coli* ที่มีการเคลื่อนที่ได้สูงสุด ได้แก่ E. *coli* K-12 เมื่อเทียบกับ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆที่มีในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย *E. coli* Nissle, *E. coli* BL21, *E. coli* DH5-α และ *E. coli* K-12 ด้วยวิธี Semi solid plate agar โดยผลคือ *E. coli* K-12 ซึ่งมีการเคลื่อนที่สูงสุด แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณแฟลกเจลลาในปริมาณมาก ใช้กระบวนการ Transformation ด้วยหลักการ Heat-shock transformation พลาสมิด pBADS1 เข้าสู่ *E. coli* K-12 จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Colony PCR พบว่าผลของการทำ Colony PCR ที่ได้มีขนาด PCR product ประมาณ 1,700 bp ซึ่งมีขนาดที่สอดคล้องกับผลที่ได้จากพลาสมิด pBADS1 ซึ่งถูกนำมาใช้เป็น Positive control โดยชิ้นส่วนยีน *flic-S1-strep tag* พบว่ามีขนาดประมาณ 1,700 bp

จากนั้นนำเชื้อที่ได้จากโคโลนีที่ให้ผลการทำ Colony PCR เป็นบวก มาทำการเพาะเลี้ยงใน LBA broth และทำการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน FliC-S1-strep tag โดยทำการกระตุ้นด้วย 1 mM arabinose และมีการยับยั้งการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM glucose จากนั้นทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ภายในเชื้อ *E. coli* K-12 ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot ทำได้โดยเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBADS1 ที่ผ่านการตรวจวัดด้วยวิธี PCR ให้ผล Positive แสดงให้เห็นว่าการ Transformation พลาสมิดสามารถเข้าสู่ *E. coli* K-12 ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านได้ และในการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน FliC-S1-Strep tag ด้วยหลักการ SDS-PAGE และ Western Blotting นั้นสามารถเลือกโคโลนีใดก็ได้จาก Plate ที่ให้ผล PCR positive เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการใส่ยา Ampicillin ทำให้เชื้อ *E. coli* K-12 ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านและไม่มีในส่วนของพลาสมิด pBADS1 ไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่ในทางกลับกันเชื้อ *E. coli* K-12 ที่มีในส่วนของพลาสมิด pBADS1 จะสามารถอยู่รอด เพราะในพลาสมิด pBADS1 มียีนที่ดื้อต่อยา Ampicillin และผลจากการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ เนื่องจากการทดสอบไม่มีความจำเพาะต่อชนิดโปรตีน ดังนั้นจึงทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี Western Blotting โดยใช้ antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนแต่ละตัว ได้แก่ Anti-rabbit Strep tag IgG เป็น

Primary antibody ต่อ โปรตีน Strep tag และมี Anti-rabbit IgG conjugated with HRP เป็น Secondary antibody ต่อ Primary antibody เมื่อเติม Western HRP substrate แล้วทำการตรวจสอบด้วยเครื่อง ChemiDoc พบว่าโปรตีนที่ได้จากเชื้อ *E. coli* K-12 ที่มีพลาสมิด pBADS1 อยู่ภายใน มีการสร้างโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 kDa แต่จากการคาดการณ์นั้นขนาดโปรตีน FliC-S1-Strep tag จะมีขนาด 59 kDa โดยโปรตีน FliC บริเวณ Export signal มีขนาด 19 kDa และโปรตีน S1 ที่พบได้ในส่วน Spike ของเชื้อ SARS-CoV-2 มีขนาด 40 kDa และแต่ถ้าหากนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน S1 มาคำนวณหาขนาดโปรตีน พบว่าโปรตีน S1 จะมีขนาดประมาณ 400 amino acid เท่านั้น หลังจากตรวจสอบแล้วว่าเชื้อ *E. coli* K-12 ที่ได้รับ พลาสมิด pBADS1 สามารถสร้างโปรตีน FliC-S1-Strep tag ได้ จึงทำการทดสอบการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกนอกเซลล์ผ่านทางแฟลกเจลลาโดยอาศัย fT3SS ของเชื้อมายังอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการนำเชื้อที่ให้ผลการทำ Colony PCR เป็นบวก ที่สามารถแสดงออกของโปรตีนโปรตีน FliC-S1-Strep tag ได้ มาทำการเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่ผสมยา Ampicillin แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.5 ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ได้บ่งบอกได้ว่าเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ log phase เมื่อค่าอยู่ในช่วงที่ต้องการ จากนั้นทำการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ arabinose ที่มีความเข้มข้นที่ 1 mM และทำการยับยั้งการสร้างโปรตีนด้วย glucose ที่มีความเข้มข้นที่ 1 mM ต่อมาทำการแยกส่วนเชื้อ *E. coli* K-12 และนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เชื้อ *E. coli* K-12 ตกตะกอน และนำส่วนใสด้านบนซึ่งเป็นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการกรองและตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% Ammonium sulfate และ acetone จากนั้นทำการตรวจสอบโปรตีนภายในเชื้อ *E. coli* K- 12 และโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western Blotting พบว่า การแสดงออกของโปรตีน FliC-S1-Strep tag ที่มีการสร้างภายในเซลล์พบว่ามีแถบขึ้นทั้งหมด 2 แถบ และการหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านทาง fT3SS พบว่ามีแถบขึ้น 1 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ 48 kDa โดยขนาดที่เล็กกว่าขนาดโปรตีนที่คาดการณ์ไว้ ดังแสดงในภาพ 15 และจากผลการทดลองการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ที่มีการแสดงของแถบที่ปรากฏทั้ง 2 แถบ อาจมีสาเหตุมาจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease ของเชื้อ *E. coli* K-12 ซึ่งจะสามารถย่อยในส่วนหัวหรือท้ายของตัวโปรตีน จึงทำให้ได้ลักษณะของโปรตีนที่เป็นไปได้มีดังนี้ ได้แก่ โปรตีน FliC-S1-Strep tag โปรตีน FliC-S1 และ โปรตีน S1-Strep tag และการหลั่งโปรตีนลูกผสมออกสู่ภายนอกเซลล์ จะต้องมีส่วนของโปรตีน FliC และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Strep tag ดังนั้นผลของ Western Blotting พบว่ามีแถบปรากฏ 1 แถบ โดยสาเหตุที่ทำให้โปรตีนลูกผสมที่สร้างภายในเซลล์และโปรตีนลูกผสมที่หลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์มีขนาดเล็กลง อาจมาจากเอนไซม์ protease ภายในเชื้อ *E. coli* K-12 ย่อยบริเวณตำแหน่งของโปรตีน FliC ทำให้เห็นขนาดของโปรตีนลูกผสมเหลือขนาดเพียง 48 kDa ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของก่อนหน้านี้ของคุณ

ชยธร ศรีสวัสดิ์ และคุณมนปวรรณ อินทรสูต ที่ได้ทำการนำ Genomic ของเชื้อ *Leptospira spp.* ตัดต่อเข้ากับพลาสมิด pBNFRB ซึ่งส่วนของโปรตีน FliC ที่มี Export signal ในการชักนำโปรตีนลูกผสมให้หลั่งออกนอกเซลล์ผ่านระบบ fT3SS จากนั้นนำพลาสมิดที่สร้างขึ้นเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อเพิ่มจำนวนและคัดเลือกพลาสมิดที่สามารถแสดงออกของโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag ก่อนนำเข้าสู่เชื้อ *Salmonella Typhimurium* เมื่อทำการกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย IPTG และนำมาทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีน FliC-GST-LipL41-6xHis tag พบว่ามีการสลายไปของโปรตีน FliC เช่นเดียวกัน เนื่องจากผลการทำ Western blot พบโปรตีนในตำแหน่งที่ต่ำลงมา ซึ่งโปรตีนที่พบมีขนาดน้อยกว่าจากที่คำนวณและเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อ Anti-GST antibody (30) ดังนั้นจากการที่มีการย่อยสลายของโปรตีน FliC จึงส่งผลให้ขนาดของโปรตีนลูกผสมที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* K-12 ในงานวิจัยชิ้นนี้มีขนาดของโปรตีนเหลือประมาณ 48 kDa

ในอนาคตคณะผู้จัดทำมีแนวทางในการพัฒนาและพัฒนาโดยการตัดแต่งสายพันธุ์ *E. coli* K-12 ให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ protease ภายในเซลล์ โดยการตัดแต่งยีนในส่วนของ protease เช่น *htra, tsp, lon, clpA, clpP และ ptr* ซึ่งเป็นยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ และถ้าต้องการโปรตีนลูกผสม (Recombinant protein) ที่สมบูรณ์และสามารถหลั่งออกมาสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก นอกจากปัจจัยของเอนไซม์ protease ภายในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* K-12 แล้วยังขึ้นกับระบบแฟลกเจลลา ซึ่งในงานวิจัยนี้ ทางคณะผู้วิจัยสนใจการหลั่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านระบบ fT3SS เนื่องจากเป็นระบบแฟลกเจลลาที่สามารถหลั่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว สอดคล้องกับงานวิจัยในปี ของ Manuel Halte และ Marc Erhardt (31) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะหาเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติของระบบแฟลกเจลลาดังกล่าวมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) ในการสร้างโปรตีนทั้งภายในเซลล์และการหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ และจากการทดลองหา Motility พบว่า *E. coli* K-12 มีการเคลื่อนที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ และ *E. coli* K-12 เป็นเชื้อ Risk group 1 ไม่ก่อโรคในคน เมื่อเทียบกับเชื้อ Salmonella spp. ที่มีระบบแฟลกเจลลาปริมาณมากเช่นกัน แต่เป็นเชื้อ Risk group 2 ที่สามารถก่อโรคในคนได้ แต่การหลั่งโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ของตัวเชื้อ *E. coli* K-12 นั้นอาจเกิดจากการที่เซลล์มีการแตก (Cell lysis) จึงทำให้สามารถพบโปรตีนที่สนใจที่มีการสร้างภายในเซลล์ ออกมาสู่ยังที่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงต้องมีการตรวจสอบการหลั่งโปรตีนสู่อาหารเลี้ยงเชื้อว่ามีการหลั่งผ่านระบบ fT3SS จริงหรือไม่ โดยการ Knockout gene ของเชื้อ *E. coli* K-12 ให้ไม่มีการสร้างในส่วนของแฟลกเจลลา เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* K-12 ที่ไม่มีการ Knockout gene เพื่อดูการหลั่งของโปรตีนที่เราสนใจออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อผ่านระบบ fT3SS ด้วยหลักการ SDS-PAGE และ Western Blotting และนอกจากนี้ จากงานวิจัยของ Spela Peternel และ Radovan Komel (32) พบว่าสามารถแยกโปรตีนลูกผสมจากการสร้างโดยแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบ คือ Soluble protein และ Insoluble

protein (Inclusion bodies) ออกจากกันได้ด้วยคลื่นเสียง (Sonication) ดั่งผลการทำ Western Blotting และจากผลการทดสอบพบการสร้างโปรตีนภายในเซลล์มีแถบปรากฏขึ้น 2 แถบ อาจจะเป็นในส่วนของ soluble protein หรือ insoluble protein (inclusion bodies) จึงต้องมีการทดสอบการตกตะกอนของโปรตีนด้วยคลื่นเสียง (sonication) จึงสามารถแยกระหว่าง insoluble protein (inclusion bodies) กับ soluble protein ได้ และวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยหลักการ SDS-PAGE และ Western Blotting ต่อไป ในปี 1995 งานวิจัยของ Luz-Maria Guzman และคณะ (33) กล่าวว่าต้องมีการกำหนด ปรับเปลี่ยน การแสดงออกของเวกเตอร์ที่มียีน pBAD promoter ที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกด้วย arabinose เนื่องจากเมื่อมีการกระตุ้นด้วย arabinose ก็จะเริ่มการ transcription ของโปรตีน แต่ถ้าไม่มีการกระตุ้นก็จะมีระดับการแสดงออกที่น้อยลง และเมื่อใส่ glucose ก็จะไปยับยั้งการ transcription เหนี่ยวนำให้ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเกิดขึ้นได้ ดังนั้นอาจทำการปรับเปลี่ยนตัวกระตุ้น arabinose และตัวยับยั้ง glucose เช่น การลดอุณหภูมิในการบ่ม การปรับลดความเข้มข้นของ arabinose และ glucose หรือการเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม เพื่อที่จะได้โปรตีนในส่วนของ soluble protein เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะสามารถนำโปรตีนที่สร้างไปใช้ประโยชน์ต่อไปหรือนำวิธีการดังกล่าวใช้ในการสร้างโปรตีนชนิดอื่นที่มีปัญหาเช่นเดียวกัน

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการสกัดพลาสมิด pBADS1 จากเชื้อ *E. coli* แล้วนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* K-12 โดยอาศัยหลักการ Heat-shock transformation แล้วทำการเพิ่มชิ้นส่วนยีน *flic-s1-strep tag* ด้วยเทคนิค PCR แล้วทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า เชื้อ *E. coli* K-12 นั้นมีพลาสมิด pBADS1 อยู่ภายใน จากนั้นทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนภายในเซลล์และการหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกมาภายนอกเซลล์ผ่านทางแฟลกเจลลา โดยอาศัย Type 3 secretion system (T3SS) ของเชื้อ *E. coli* K-12 ด้วยวิธี SDS-PAGE และ western Blotting พบว่า เชื้อ *E. coli* K-12 สามารถสร้างโปรตีนลูกผสม FliC-S1-Strep tag ขนาดประมาณ 42-54 kDa ไว้ภายในเซลล์ได้ แสดงว่า *E. coli* K-12 ที่มีพลาสมิด pBADS1 สามารถสร้างและหลั่งโปรตีน FliC-S1-Strep tag ออกสู่นอกเซลล์ผ่านทางแฟลกเจลลา โดยอาศัย Type 3 secretion system (T3SS) ได้ แต่มีขนาดเล็กกว่าจากที่คาดการณ์ไว้