The Journal of Applied Science **Vol. 16 No. 2: 37-46 [2017]**
วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ doi: 10.14416/j.appsci.2017.10.001
ISSN 1513-7805 Printed in Thailand

Research Article

การตกผลึกและการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของเอนไซม์ Os4BGlu18 จากข้าว

Crystallization and X-ray diffraction analysis of rice Os4BGlu18

สุภาภรณ์ ใบยา[1]* สลิลา เพ็งไธสง[2] และเจมส์ เกตุทัต คาร์นส์[2]

Supaporn Baiya[1]* Salila Pengthaisong[2] and James Ketudat Cairns[2]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ ศรีราชา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี 20230

[1]Faculty of Science at Sriracha, Kasetsart University, Sriracha Campus, Sriracha, Chonburi 20230

[2]สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

[2]School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Muang, Nakhon Ratchasima 30000

***E-mail**: supaporn.bai@ku.ac.th

Received: 16/07/2017; Accepted: 3/10/2017

บทคัดย่อ

เอนไซม์ Os4BGlu18 จากข้าวเป็นเอนไซม์ในกลุ่มมอโนลิกนอลบีตา-กลูโคซิเดส ที่สามารถย่อยสารในกลุ่มมอโนลิกนอลกลูโคไซด์ซับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย coniferin, syringin, และ *p*-coumatyl alcohol glucoside ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าซับสเตรตจากธรรมชาติชนิดอื่น งานวิจัยนี้ผลิตเอนไซม์ Os4BGlu18 ใน *Escherichia coli* ด้วยการรวมเข้ากับ thioredoxin-His_6 tag และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) มีการตัดปลายแอมิโนของเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่มี thioredoxin-His_6 tag ออกและทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยคอลัมน์ IMAC การตกผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 ด้วยวิธี microbatch ประสบความสำเร็จโดยพบผลึกรูปร่างกลมยาวจำนวนมาก เมื่อใช้สารตกผลึกที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์, pH 8.5 และ polyethylene glycol 3350 25% ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 แบบอิสระและแบบที่รวมอยู่กับ 2-deoxy-2-fluoroglucose (G2F) สามารถเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ที่ความยาวคลื่น 1.0 อังสตรอม และใช้เครื่องตรวจจับ ADSC Quantum 315 CCD ได้ด้วยความละเอียด 6.5 และ 7.0 อังสตรอม ตามลำดับ การวิเคราะห์

ทางด้านผลึกศาสตร์ของเอนไซม์ Os4BGlu18 อิสระพบว่ามีดัชนีออร์โธรอมบิกสเปซกลุ่ม $P2_12_12_1$ และขนาดของยูนิตเซลล์มีค่า a เท่ากับ 163.8 อังสตรอม, b เท่ากับ 167.4 อังสตรอม และ c เท่ากับ 240.2 อังสตรอม สำหรับผลึกของเอนไซม์ที่รวมอยู่กับ G2F พบว่ามีดัชนีเตตร้าโกนัลสเปซกลุ่ม $P4_22_12$ และขนาดของยูนิตเซลล์มีค่า a เท่ากับ 164.5 อังสตรอม, b เท่ากับ 164.5 อังสตรอม และ c เท่ากับ 241.0 อังสตรอม

คำสำคัญ: มอโนลิกนอลบีตา-กลูโคซิเดส, 2-ดีออกซี-2-ฟลูโอโรกลูโคส, การตกผลึกด้วยวิธีไมโครแบช

Abstract

Rice Os4BGlu18 was proposed to be a monolignol β-glucosidase and has been shown to hydrolyze the monolignol glucoside substrates, coniferin, syringin, and *p*-coumatyl alcohol glucoside, with higher catalytic efficiency than other natural substrates. The Os4BGlu18 protein was produced as a thioredoxin-His_6 fusion protein in *Escherichia coli* and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The N-terminal thioredoxin-His_6 tag was cutoff and the protein was further purified by a second IMAC step. Screening in microbatch crystallization showed that Os4BGlu18 could be successfully crystallized to form many crystals with rod shape. The rod shaped crystals were grown in a precipitant solution containing 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, and 25% polyethylene glycol 3350 after 3 weeks of incubation at 15ºC. The crystals of free Os4BGlu18 and its complex with 2-deoxy-2-fluoroglucose (G2F) could diffract X-rays at a 1.0 Å wavelength x-ray beam and an ADSC Quantum 315 CCD detector with nominal resolutions of 6.5 and 7.0 Å, respectively. The crystallographic analysis of free Os4BGlu18 showed that it was indexed to the orthorhombic $P2_12_12_1$ space group, and had the unit cell parameters: a = 163.8 Å, b = 167.4 Å, c = 240.2 Å. For the G2F complex, it was indexed to the tetragonal $P4_22_12$ space group, and had the unit cell parameters: a = 164.5 Å, b = 164.5 Å, c = 241.0 Å.

Keywords: monolignol β-glucosidase, 2-deoxy-2-fluoroglucose, microbatch crystallization

บทนำ

เอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากพืชจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไกลโคไซไฮโดรเลส โดยเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยน้ำที่ตำแหน่งบีตา-ไกลโคซิดิกของสารประกอบหมู่แอริลและแอลคิลบีตา-ดี-กลูโคไซด์และสารประกอบกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ เพื่อปลดปล่อยโมเลกุลกลูโคสและอะไกลโคนออกมา เอนไซม์ประเภทนี้พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดได้แก่ อาร์เคีย แบคทีเรีย เห็ดรา พืช และสัตว์ ในพืชมีการรายงานว่าเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสมีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง เช่น การย่อยโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผนังเซลล์ของพืช การปลดปล่อยสารป้องกันตนเอง

ของพืชจากรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ให้กลายเป็นรูปที่สามารถทำงานได้ การควบคุมสารในกลุ่มฮอร์โมนพืช การเกิดปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำกับสารในกลุ่มแอลคาลอยด์แอแนบอลิกอินเทอร์มีเดียตกลูโคไซด์สำหรับการสร้างมอโนเทอร์พีนแอลคาลอยด์ในวิถีเมแทบอลิซึม การปลดปล่อยสารระเหยง่ายภายในเซลล์พืช รวมถึงการปล่อยสารในกลุ่มมอโนลิกนอลซึ่งเป็นหน่วยการสร้างลิกนินในพืช (Opassiri et al., 2006; Ketudat Cairns & Esen, 2010)

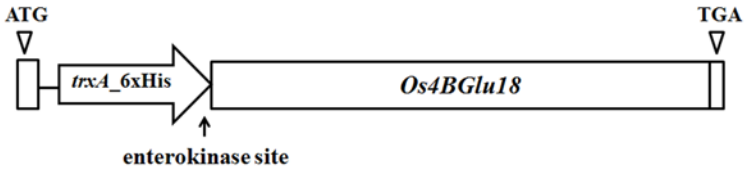
ในธรรมชาติสารกลุ่มมอโนลิกนอลกลูโคไซด์ที่ประกอบด้วย coniferin, syringin และ *p*-coumaryl alcohol glucoside จัดเป็นสารประกอบสำหรับการเคลื่อนที่หรือสำหรับการเก็บสะสมไว้ของมอโนลิกนอลเพื่อใช้ในการสร้างลิกนิน เมื่อพืชต้องการสร้างลิกนิน เอนไซม์มอโนลิกนอลบีตา-กลูโคซิเดสที่จำเพาะต่อการปลดปล่อยสารกลุ่มมอโนลิกนอลกลูโคไซด์จะเข้ามาตัดเอากลูโคสออกทำให้ได้มอโนลิกนอลที่สามารถนำไปสร้างลิกนินได้ต่อไป ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์มอโนลิกนอลบีตา-กลูโคซิเดสเคยมีการศึกษาในพืชหลายชนิดเช่น ต้นสน ถั่วลูกไก่ อะราบิดอพซิส และข้าว (Hösel et al.,1978; Dharmawardhana & Ellis, 1998; Escamilla-Treviño et al., 2006; Baiya et al., 2014) จากการเทียบลำดับความเหมือนของกรดแอมิโนของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสในข้าวและอะราบิดอพซิส พบว่า Os4BGlu14, Os4BGlu16, และ Os4BGlu18 ในข้าวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับมอโนลิกนอลบีตา-กลูโคซิเดส (BGlu45 และ BGlu46) ในอะราบิดอพซิส (Opassiri et al., 2006) เมื่อทำการศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ Os4BGlu16 และ Os4BGlu18 พบว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถทำปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำกับสารกลุ่มมอโนลิกนอลกลูโคไซด์ทั้ง 3 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งกว่าสารตั้งต้นจากธรรมชาติชนิดอื่น ๆ แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ที่จำเพาะของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อกระบวนการสร้างลิกนินภายในเซลล์พืช (Baiya et al., 2014)

เพื่อให้เข้าใจถึงโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของเอนไซม์มอโนลิกนอลบีตา-กลูโคซิเดสให้มากขึ้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกเอนไซม์ Os4BGlu18 มาทำการตกผลึกเพื่อให้เหมาะต่อการศึกษาโครงสร้างโปรตีนด้วยเทคนิคทางผลึกวิทยา

วิธีการทดลอง

1. การผลิตและการแยกเอนไซม์ Os4BGlu18 ให้บริสุทธิ์

ดีเอ็นเอของเอนไซม์ Os4BGlu18 ขนาด 1,500 กิโลเบสแพร์ ได้มาจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ของ cDNA จากข้าวหอมดอกมะลิ 105 อายุ 7 วัน และโคลนเข้าไปในเวคเตอร์ pET32a(+) โดยด้านปลายแอมิโนของเอนไซม์ถูกเชื่อมเข้ากับ thioredoxin-His_6 tag ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ enterokinase ดังแสดงในรูปที่ 1 จากนั้นดีเอ็นเอสายผสมนี้ถูกย้ายเข้าไปในแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) ตามการรายงานของ Baiya et al. (2014)



รูปที่ 1. แผนภาพดีเอ็นเอสายผสมของเอนไซม์ Os4BGlu18

การชักนำให้เอนไซม์ Os4BGlu18 แสดงออกทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสม pET32a/Os4BGlu18 อยู่ภายในเซลล์ด้วยอาหารชนิด Luria broth (LB) ซึ่งเติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กานามัยซินความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตตราไซคลีนความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในอาหารและเลี้ยงเซลล์ภายในเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.6 จึงทำการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ Os4BGlu18 ด้วย isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียแยกออกจากอาหาร LB โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทำการสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อให้เอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ถูกสร้างภายในไซโทพลาซึมของเซลล์แบคทีเรียออกมาด้วยสารสกัดบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, lysozyme ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 1% (v/v) Triton-X 100, phenylmethylsulfonylfluoride ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, Dnase I ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ soy bean trypsin inhibitor ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตรของสารสกัดบัฟเฟอร์ต่อ 1 กรัมของเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วจึงแยกเอนไซม์ Os4BGlu18 ออกจากเซลล์ที่แตกนี้ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ปรับเปลี่ยนวิธีการแยกเอนไซม์ Os4BGlu18 ให้บริสุทธิ์ต่างออกไปจากเดิม (Baiya et al., 2014) เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึก ขั้นตอนที่ 1 นำเอนไซม์ที่ได้จากการปั่นแยกออกจากเซลล์แบคทีเรียในขั้นตอนก่อนหน้านี้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ที่ชาร์จให้มีประจุด้วย Co^{2+} โปรตีนปนเปื้อนที่ไม่สามารถจับกับ IMAC เรซินได้ถูกชะล้างออกไปจากคอลัมน์ด้วย imidazole ความเข้มข้น 0-10 มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0 ที่มีเกลือ NaCl อยู่ 150 มิลลิโมลาร์ (บัฟเฟอร์ปรับสมดุล) จากนั้นเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่จับอยู่กับ IMAC เรซินถูกชะออกมาด้วย imidazole ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจสอบเอนไซม์ Os4BGlu18 ขนาดประมาณ 75 กิโลดาลตัน

โดยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้วจึงรวมส่วนของเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ต้องการเข้าด้วยกันแล้วกำจัด imidazole ออกไปโดยการกรองด้วย 30 kDa Amicon® Ultra-15 centrifugal filters ด้วยบัฟเฟอร์ปรับสมดุล ขั้นตอนที่ 2 ตัดส่วนปลายแอมิโน thioredoxin-His_6 tag ออกโดยใช้เอนไซม์ enterokinase ในอัตราส่วน 1 ไมโครกรัม enterokinase ต่อ 1 มิลลิกรัมเอนไซม์ Os4BGlu18 ทำการบ่มเอนไซม์ Os4BGlu18 กับเอนไซม์ enterokinase ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อบ่มเสร็จแล้วจึงทำการแยกเอนไซม์ Os4BGlu18 ออกจาก thioredoxin-His_6 tag อีกครั้งด้วยคอลัมน์ IMAC เนื่องจากเอนไซม์ Os4BGlu18 ถูกตัดเอาส่วนที่สามารถจับกับ IMAC เรซินออกไปแล้วทำให้การทำบริสุทธิ์ในครั้งนี้เอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ต้องการจะถูกชะออกมาก่อนในขั้นตอนการล้างด้วยบัฟเฟอร์ปรับสมดุลที่มี imidazole อยู่ 0-5 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจสอบหาเอนไซม์ Os4BGlu18 ขนาดประมาณ 56 กิโลดาลตันอีกครั้งด้วยเทคนิค SDS-PAGE และทดสอบเพื่อยืนยันว่าเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ได้มานี้ยังสามารถทำหน้าที่ได้ด้วยการทดสอบกับสารตั้งต้น *p*-nitrophenol β-D-glucopyranoside ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใน sodium acetate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 5.0 จากนั้นจึงทำการกำจัด imidazole ออกไปอีกครั้งด้วย 10 kDa Amicon® Ultra-15 centrifugal filters

2. การตกผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18

ก่อนทำการตกผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 ได้ทำการปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้อยู่ที่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและกำจัดจุลินทรีย์ ฝุ่น และเอนไซม์บางส่วนที่อาจตกตะกอน ซึ่งปนเปื้อนอยู่นี้ออกไปด้วยการกรองผ่าน Ultrafree-MC filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นจึงเริ่มตกผลึกด้วยการใช้ชุดสารสำหรับตกผลึกโปรตีนชนิด HR2-130 (Hampton Research, CA, USA), HR2-134 (Hampton Research), และ Morpheus™46 (Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) เทคนิคที่ใช้ในการตกผลึกเป็นแบบ Microbatch โดยใช้เพลทขนาด 96 หลุม เริ่มจากการเติม 100% Paraffin oil ลงไปในหลุม 10 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารสำหรับตกผลึก 1 ไมโครลิตร ลงไปบริเวณก้นหลุม แล้วจึงใส่เอนไซม์ Os4BGlu18 (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร ลงไปที่ก้นหลุมให้รวมเป็นหยดเดียวกันกับสารตกผลึก ปิดฝาเพลทเพื่อป้องกันฝุ่นและเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฟองน้ำเปียกชื้นอยู่ แล้วจึงนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลึกโปรตีนที่จะเกิดขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3. การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์และการวิเคราะห์ด้านผลึกศาสตร์

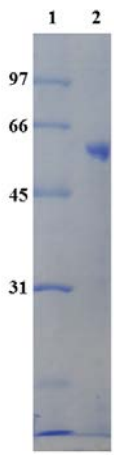
ผลึกที่เกิดขึ้นถูกเกี่ยวขึ้นมาแช่ในสารป้องกันการแช่แข็งซึ่งประกอบด้วย glycerol 18% (v/v) ในสารตกผลึกที่พบผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 โดยเพิ่มความเข้มข้นจากเดิม 15% ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 บางส่วนจะถูกนำมาแช่กับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ ได้แก่ 2-deoxy-2-fluoroglucose (G2F) ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเกี่ยวผลึกไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ผลึกของเอนไซม์

 doi: 10.14416/j.appsci.2017.10.001

Os4BGlu18 และผลึกที่แช่ใน G2F ถูกนำไปทดสอบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ที่ National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC, Hsinchu, Taiwan) ที่มีความยาวคลื่นในการทดสอบ 1 อังสตรอม ที่ BL15A beamline และตรวจจับด้วยเครื่อง ADSC Quantum 315 CCD detector ผลึกถูกรักษาความเย็นไว้ที่อุณหภูมิ 110 องศาเคลวินด้วยแก๊สไนโตรเจนในระหว่างที่ทำการทดสอบ ชุดข้อมูลที่เก็บได้ทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม HKL-2000 package (Otwinowski and Minor, 1997) และ CCP4 suite

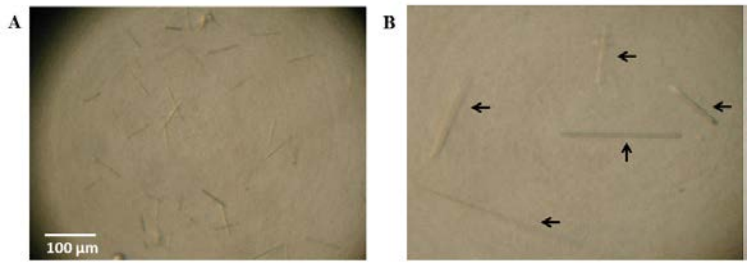
ผลการทดลอง

การผลิตเอนไซม์ Os4BGlu18 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ origami (DE3) โดยการเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ Os4BGlu18 ในปริมาณ 4 มิลลิกรัม ตามการรายงานของ Baiya et al. (2014) เอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย 2 ขั้นตอน ด้วยคอลัมน์ IMAC ทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% โดยการประเมินจาก SDS-PAGE ตามรูปที่ 2 และมีขนาดประมาณ 56 กิโลดาลตัน



รูปที่ 2. SDS-PAGE ของเอนไซม์ Os4BGlu18 หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ IMAC ในขั้นตอนที่ 2 ช่องที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐาน (หน่วยกิโลดาลตัน) และช่องที่ 2 คือเอนไซม์ Os4BGlu18 ขนาด 56 กิโลดาลตัน

การตกผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 โดยใช้ชุดสารสำหรับตกผลึกโปรตีน 3 ชนิดคือ HR2-130, HR2-134, และ Morpheus™46 พบว่า ชุดสารสำหรับตกผลึกโปรตีนชนิด HR2-134 (D11) ซึ่งประกอบด้วย Tris pH 8.5 0.1 M และ PEG 3350 25% (w/v) สามารถตกผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 ในรูปร่างกลมยาวขนาดต่าง ๆ ได้โดยใช้เวลาในการบ่ม 3 อาทิตย์ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3. ผลึกรูปร่างกลมยาวตามลูกศรของเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่พบในสารตกผลึกโปรตีนชนิด HR2-134 (D11) ภาพถ่ายมุมกว้าง (A) และภาพถ่ายมุมแคบ (B)

ผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 ถูกนำไปวิเคราะห์การเลี้ยวเบนด้วยรังสีเอ็กซ์ ข้อมูลที่เก็บมาได้จากการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 และผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่แช่ใน G2F ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ถูกนำมาวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่ผลึกเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่แช่ใน G2F ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ไม่สามารถเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ได้ หลังจากวิเคราะห์ข้อมูลแล้วปรากฏว่าผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 สามารถเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ได้ที่ความละเอียด 6.5 อังสตรอม จัดอยู่ในกลุ่มดัชนีออร์โธรอมบิกสเปซ $P2_12_12_1$ ด้วยยูนิตเซลล์พารามิเตอร์ดังนี้ a เท่ากับ 163.8 อังสตรอม, b เท่ากับ 167.4 อังสตรอม และ c เท่ากับ 240.2 อังสตรอม ส่วนผลึกของโปรตีน Os4BGlu18 ที่แช่ใน G2F ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ได้ที่ความละเอียด 7.0 อังสตรอม อยู่ในกลุ่มดัชนีเตตร้าโกนัลสเปซ $P4_22_12$ และยูนิตเซลล์พารามิเตอร์มีขนาดดังนี้ a เท่ากับ 164.5 อังสตรอม, b เท่ากับ 164.5 อังสตรอม และ c เท่ากับ 241.0 อังสตรอม

ตารางที่ 1. ข้อมูลการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ของผลึกโปรตีน Os4BGlu18 และผลึกโปรตีน Os4BGlu18 ที่ถูกแช่ใน G2F

	Os4BGlu18	**Os4BGlu18 ที่แช่ใน G2F**
ความละเอียด (อังสตรอม)	6.5	7.0
ระบบกลุ่มสเปซ	$P2_12_12_1$	$P4_22_12$
ขนาดของยูนิตเซลล์	a = 163.8	a = 164.5
(อังสตรอม)	b = 167.4	b = 164.5
	c = 240.2	c = 241.0
	α = 90.0	α = 90.0
	β = 90.0	β = 90.0
	γ = 90.0	γ = 90.0

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

เอนไซม์ Os4BGlu18 ถูกโคลนขึ้นมาโดยรวมเอาส่วนปลายแอมิโนเชื่อมเข้ากับ thioredoxin-His$_6$ tag เพื่อความสะดวกในการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ IMAC อย่างไรก็ตามส่วนปลายแอมิโนนี้อาจรบกวนการตกผลึกของโปรตีนได้ ทำให้ต้องมีการตัดเอาส่วนปลายนี้ออกโดยใช้เอนไซม์ enterokinase ซึ่งวิธีนี้ได้รับผลสำเร็จอย่างดีสำหรับเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสในไอโซไซม์อื่น ๆ จากข้าว เช่น Os3BGlu6, Os3BGlu7, และ Os7BGlu26 (Chuenchor et al., 2008; Seshadri et al., 2009; Tankrathok et al., 2013) จากผลการผลิตและทำให้เอนไซม์ Os4BGlu18 บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ IMAC 2 ขั้นตอน ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมากพอสำหรับการตกผลึก เนื่องจากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์โดยเทคนิคผลึกวิทยา จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูง จึงจะทำให้เอนไซม์กลายเป็นผลึกได้ แตกต่างจากการศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์โดยการตรวจหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นด้วยการวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งที่มีประสิทธิภาพสูงของเอนไซม์ จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากก็สามารถตรวจหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้ และด้วยความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่มากถึง 98% จากการประเมินด้วยเทคนิค SDS-PAGE จึงทำให้การตกผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 ประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้ชุดตกผลึกโปรตีนที่นำมาใช้มีความหลากหลายของสารที่ใช้ในการตกผลึก ช่วยให้ผู้วิจัยค้นพบสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีนตกผลึกได้ในเวลาอันสั้น โดยพบผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 อาทิตย์ ในสารตกผลึกที่ประกอบด้วย Tris pH 8.5 0.1 M และ PEG 3350 25% (w/v) และเพื่อป้องกันการละลายของผลึกในอุณหภูมิที่สูงกว่า 15 องศาเซลเซียสในระหว่างการเลี้ยวเบนด้วยรังสีเอ็กซ์ ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 จะแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ 110 องศาเคลวินด้วยแก๊สไนโตรเจนและมี glycerol 18% ซึ่งเป็นสารป้องกันการแช่แข็งของผลึกเอนไซม์ ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ทำการแช่ใน G2F สามารถใช้ความเข้มข้นได้สูงถึง 10 มิลลิโมลาร์โดยไม่ทำให้ผลึกเกิดความเสียหาย ในขณะที่ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 ที่ทำการแช่ใน G2F ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ส่งผลต่อความสามารถในการจับของเอนไซม์กับสารยับยั้งได้ลดลง ทำให้หลังจากวิเคราะห์แล้วไม่พบ G2F ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu18 แบบอิสระและที่แช่ใน G2F ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ได้ที่ความละเอียด 6.5 และ 7.0 อังสตรอม ตามลำดับ Os4BGlu18 แบบอิสระจัดอยู่ในกลุ่มดัชนีออร์โธรอมบิกสเปซ $P2_12_12_1$ ส่วน Os4BGlu18 ที่แช่ใน G2F จัดอยู่ในกลุ่มดัชนีเตตร้าโกนัลสเปซ $P4_22_12$ แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ของเอนไซม์ Os4BGlu18 ว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เหมาะสมพอดีกับสารตั้งต้นขณะทำปฏิกิริยา ซึ่งสนับสนุนทฤษฎีเหนี่ยวนำให้พอดีของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น ดังนั้นวิธีการผลิตโดยทำให้เอนไซม์ Os4BGlu18 บริสุทธิ์และสารตกผลึกที่กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีการที่เหมาะสม ซึ่งทำให้เอนไซม์สามารถตกผลึกและเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

Baiya, S., Hua, Y., Ekkhara, W. & Ketudat Cairns, J. R. (2014). Expression and enzymatic properties of rice (*Oryza sativa* L.) monolignol beta-glucosidases. *Plant Science*, *227*(1), 101-109. doi:10.1016/j.plantsci.2014.07.009

Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Robinson, R. C., Yuvaniyama, J., Oonanant, W., Bevan, D. R., et al. (2008). Structural insights into rice BGlu1 β-glucosidase oligosaccharide hydrolysis and transglycosylation. *Journal of Molecular Biology*, *377*(4), 1200-1215. doi:10.1016/j.jmb.2008.01.076

Dharmawardhana, D. P. & Ellis, B. E. (1998). β-Glucosidases and glucosyltransferase in lignifying tissues. *Journal of the American Chemical Society*, 697(6), 76-83. doi:10.1021/bk-1998-0697.ch006

Escamilla-Treviño, L. L., Chen, W., Card, M. L., Shih, M.-C., Cheng, C. L. & Poulton, J. E. (2006). *Arabidopsis thailiana* β-glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry*, *67*(15), 1651-1660. doi:10.1016/j.phytochem.2006.05.022

Hösel, W., Surholt, E. & Borgmann, E. (1978). Characterization of β-glucosidase isoenzymes possibly involved in lignifications from chick pea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension culture. *European Journal of Biochemistry*, *84*(2), 487-492. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12190.x

Ketudat Cairns, J. R. & Esen, A. (2010). β-Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(20), 3389-3405. doi:10.1007/s00018-010-0399-2

Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A. & Ketudat Cairns, J. R. (2006). Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β-glucosidase. *BMC Plant Biology*, *6*(1), 33-51. doi:10.1186/1471-2229-6-33

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In C. W. Carter & R. M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology* (Volume 276) pp. 307-326. New York: Academic Press.

Seshadri, S., Akiyama, T., Opassiri, R., Kuaprasert, B. & Ketudat Cairns, J. R. (2009). Structural and enzymatic characterization of Os3BGlu6, a rice β-glucosidase hydrolyzing hydrophobic glycosides and (1⟶3)- and (1⟶2)-linked disaccharides. *Plant Physiology*, *151*(1), 47-58. doi: 10.1104/pp.109.139436

Tankrathok, A., Iglesias-Fernández, J., Luang, S., Robinson, R. C., Kimura, A., Rovira, C., et al. (2013). Structural analysis and insights into the glycon specificity of the rice GH1 Os7BGlu26 β-D-mannosidase. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *69*(10), 2124-2135. doi:10.1107/ S0907444913020568