รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนนิ่งและการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส จากเชื้อ *Vibrio cholerae*

Cloning, expression and biochemical characterization of tryptophanase (Trpase) enzyme from *Vibrio cholerae*

ดร.นัฐ ตัณศิลา หัวหน้าโครงการวิจัย
ศ.ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ผู้ร่วมโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภท ทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2553 รหัสโครงการ MET530228S

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อ	1
1. ชื่อโครงการ	3
2. รายชื่อคณะผู้วิจัย	3
3. แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย	3
4. ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย	3
5. วันเริ่มและปิดโครงการวิจัย	3
6. เนื้อหาโดยสรุป (executive summary)	3
6.1 ที่มาและความสำคัญ	3
6.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย	5
6.3 ระยะเวลาในการวิจัย	5
6.4 แหล่งทุนสนับสนุน	5
6.5 ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง	5
1) เชื้อแบคทีเรียที่ใช้และการสกัดโครโมโซม	5
2) การแยกและเพิ่มจำนวนยีน *tna*A จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966	6
3) การเตรียม DNA vector และ DNA insert สำหรับโคลนนิ่งด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I	7
4) การ Ligation และ การนำ recombinant DNA เข้าสู่ *E. coli* host cells	9
5) การเปลี่ยนกรดอะมิโนเฉพาะตำแหน่งของยีน *tna*A ด้วยวิธี site-directed mutagenesis	11
6) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากแบคทีเรียหลายชนิด	16
7) การแสดงออกและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+}-NTA affinity chromatography	18
8) การวัดความเข้มข้นโปรตีน, ระดับ Trpase activity และค่า kinetics	19
6.6) สรุปผลการทดลองและการอภิปรายผลการวิจัย	23
6.7) เอกสารอ้างอิง	24

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ PCR สำหรับเพิ่มปริมาณ *tna*A gene 6

ตารางที่ 2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณ *tna*A gene 7

ตารางที่ 3 ส่วนผสมสำหรับการตัดต่อ *tna*A gene เข้าสู่ pET-20b(+) 8

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ *tna*A gene เข้าสู่ pET-20b(+) vector 9

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบ site-directed mutagenesis PCR ของ *tna*A gene 12

ตารางที่ 6 สภาวะการทำปฏิกิริยา site-directed mutagenesis PCR ของ *tna*A gene 12

ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของ wild type *tna*A gene และ mutants ตำแหน่งต่าง ๆ 15

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* กับเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดอื่น 16

ตารางที่ 9 การทำโปรตีน VcTrpase ให้บริสุทธิ์และระดับ Trpase activity ของ VcTrpase mutants 19

ตารางที่ 10 ค่า kinetics ของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* PSU966 22

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 PCR products ของ *ompW* gene จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966 5

รูปที่ 2 ผลการสกัดโครโมโซมของเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966 6

รูปที่ 3 PCR product ของยีน *tna*A 7

รูปที่ 4 การเตรียม pET-20b(+) plasmid vector และ *tna*A DNA insert 8

รูปที่ 5 ผลการทดสอบ indole test ในหลอดทดลอง 10

รูปที่ 6 ผลการตัดพลาสมิดที่สกัดจาก transformant หมายเลข 5156 และ 5157 ด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I 10

รูปที่ 7 ผล PCR amplification ของ *tna*A gene (ขนาด 1.4 Kb) จาก transformants 11

รูปที่ 8 การทดสอบ indole ของ wild type VcTrpase และ VcTrpase mutants 13

รูปที่ 9 Agarose gel electrophoresis ของการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป 13

รูปที่ 10 PCR amplification ยีน *tna*A gene ของ wild type VcTrpase และ VcTrpase mutants 14

รูปที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* กับเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดอื่น 17

รูปที่ 12 แสดงผลการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+}-NTA affinity chromatography ของ wild type VcTrpase 18

รูปที่ 13 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ VcTrpase เมื่อใช้ L-tryptophan เป็นซับสเตรท 20

รูปที่ 14 pH ที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ VcTrpase เมื่อใช้ L-tryptophan เป็นซับสเตรท 21

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การโคลนนิ่งและการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *Vibrio cholerae* ได้รับงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททั่วไป จากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2553 ระยะเวลาการดำเนินการทั้งสิ้น 3 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2556

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเทคนิคการแพทย์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ตลอดจน ดร.รัตนา เรืองไรรัตนโรจน์, รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาพ เกียรติทับทิว และรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ที่กรุณาให้คำปรึกษา สนับสนุนส่งเสริมการวิจัยทั้งด้านวิชาการและแรงกระตุ้นในการทำวิจัย ขอขอบคุณ Prof. Dr. Robert S. Phillips ที่ให้ความอนุเคราะห์ *E. coli* host cells ในงานวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ น.ส.ขวัญชนก วรเดช, น.ส.นฤมา บาฮะคีรี, น.ส.ศิริวรรณ เสียมไหม, น.ส.พิระภรณ์ ชมชื่น, นายภัทธิพงศ์ ภัทรนิตย์, นายศุภโชค เอ้งฉ้วน นักศึกษาปริญญาตรี คณะเทคนิคการแพทย์ และน.ศ.ตัยยีบ๊ะ นุ้ยเดช นักศึกษาปริญญาเอก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับการมีส่วนร่วมในการทดลองของโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

27 พ.ค. 2557

บทคัดย่อ

เอนไซม์ทริปโตเฟนเนสเป็นเอนไซม์ที่พบได้เฉพาะในสิ่งมีชีวิต prokaryote เท่านั้น สามารถเร่งปฏิกิริยา β-elimination โดยมี L-tryptophan เป็นซับสเตรทตามธรรมชาติ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น indole, pyruvate และ NH_3 โดยงานวิจัยหลายชิ้นพบว่า indole เป็นสารสำคัญที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณกันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย หนึ่งในหน้าที่ของ indole คือควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มในแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งในเชื้อ *V. cholerae* ก็เป็นเชื้อก่อโรคท้องเสียรุนแรงและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตจาก hypovolemic shock งานวิจัยนี้จึงศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสด้วยการ cloning และการแสดงออกเอนไซม์ใน indole-deficient *E. coli* BL21(DE3) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) ขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* (VcTrpase) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 50 kDa (กรดอะมิโน 472 ตัว) มีกรดอะมิโนคล้ายคลึงเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *E. coli* และ *H. influenzae* (85% และ 84% identities ตามลำดับ) เอนไซม์ที่สกัดได้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 9.0 และมีค่าสัมประสิทธิ์ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยซับสเตรท L-tryptophan คือ K_m = 0.612 mM และ k_{cat} = 5.252 s^{-1}, ต่อซับสเตรท S-methyl-L-cysteine คือ K_m = 30.145 mM และ k_{cat} = 0.490 s^{-1}, และต่อซับสเตรท S-benzyl-L-cysteine คือ K_m = 0.210 mM และ k_{cat} = 0.346 s^{-1} จากการทดลอง site-directed mutagenesis กรดอะมิโนในตำแหน่ง conserved residues ที่สำคัญ 9 ตำแหน่ง ได้แก่ Thr52, Tyr74, Arg103, Asp137, Arg230, Lys269, Lys270, Arg419 และ His463 พบว่า VcTrpase mutants ทั้งหมดเร่งปฏิกิริยาในการย่อยซับสเตรทได้น้อยลงหรือไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เลย ผลการทดลองนี้จึงยืนยันว่าตำแหน่งกรดอะมิโนดังกล่าวสำคัญอย่างมากต่อเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสในการสร้าง indole ความรู้ที่ได้จากตรงนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบหรือค้นหาสารยับยั้ง (inhibitors) การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholerae* ได้ในอนาคต เพื่อบรรเทาความรุนแรงของโรคและลดความคงทนของเชื้อในแหล่งน้ำต่าง ๆ ตามธรรมชาติที่จะเป็นแหล่งระบาดของอหิวาตกโรคได้

Abstract

Tryptophanase (Trpase) is a pyridoxal phosphate (PLP) dependent enzyme responsible for catalytic production of indole, an important intra- and inter-species signaling molecule in bacteria. Herein, *tna*A gene of *V. cholerae* coding for VcTrpase was cloned into pET20b(+) vector, and expressed in *E. coli* BL21(DE3) *tn5:tna*A. . Using Ni^{2+}-NTA chromatography, VcTrpase was purified and possessed a molecular mass of ~50 kDa, absorption peaks at 330 and 435 nm, and specific activity of 3 U/mg protein. VcTrpase is highly identical (> 80% homology) to Trpase of *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*, but it was ~ 50% identity to Trpase of *Proteus vulgaris* and *Porphyromonas gingivalis*. Activity of enzyme was highest at pH 9.0 and 45 °C. Recombinant VcTrpase exhibited analogous kinetics reactivity to EcTrpase with K_m and k_{cat} values of 0.612×10^{-3} M and 5.252 s^{-1}, respectively. The enzyme could catalyze S-methyl-L-cysteine and S-benzyl-L-cysteine, but not L-phenylalanine and L-serine. Using site-directed mutagenesis technique, nine residues (Thr52, Tyr74, Arg103, Asp137, Arg230, Lys269, Lys270, Arg419 and His463) were conserved for enzyme catalysis. All amino acid substitution could eliminate or remarkably diminish Trpase activity. Thus, they may be potential targets in drug design for controlling *V. cholerae*.

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การโคลนนิ่งและการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *Vibrio cholerae*

(ภาษาอังกฤษ) Cloning, expression and biochemical characterization of tryptophanase (Trpase) enzyme from *Vibrio cholerae*

2. ชื่อคณะผู้วิจัย 1). ดร.นัฐ ตัณศิลา หัวหน้าโครงการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์

2). ศ.ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล นักวิจัยร่วม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

3. ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภท ทั่วไป .ประจำปี 2553

4. ระยะเวลาตลอดโครงการ 3 ปี - เดือน (รวมเวลาที่ได้รับอนุญาติให้ต่อขยายเวลาการวิจัย)

5. เริ่มโครงการวิจัยเมื่อ เดือน ตุลาคม พ.ศ 2553 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2556

6. เนื้อหาโดยสรุป (executive summary)

6.1) ที่มาและความสำคัญ

อหิวาต์ หรืออหิวาตกโรค คือโรคท้องร่วงที่รุนแรงที่สุด (1) มีสาเหตุจากการบริโภคอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* เข้าไป โรคนี้มีระยะฟักตัวสั้นประมาณ 2 ชั่วโมง – 5 วัน (โดยเฉลี่ย 1-2 วัน) (2) หลังจากได้รับเชื้อจึงจะแสดงอาการ จากสถิติที่ผ่านมาขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) รายงานว่า ผู้ที่ได้รับเชื้อชนิดนี้กว่าร้อยละ 75 จะไม่ปรากฏอาการใด ๆ (2) แต่ผู้ป่วยอีก 1 ใน 4 ที่แสดงอาการนั้นจะพบว่ามีอัตราการตายสูงมากถึงร้อยละ 50 หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง ซึ่งมีสาเหตุสำคัญมาจากการสูญเสียน้ำอย่างเฉียบพลันจนเกิดภาวะขาดน้ำรุนแรง (severe dehydration), ช็อค (shock) และเกิดภาวะไตล้มเหลว (kidney failure) (3, 4) ธรรมชาติของเชื้อ *Vibrio cholerae* นี้เมื่อถูกขับออกจากร่างกายผู้ป่วยทางอุจจาระแล้วก็สามารถไปดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้อีกเป็นเวลานาน หากแหล่งน้ำในการอุปโภคบริโภคมีการปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าไปก็จะเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาด (outbreak) สู่วงกว้างอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาและมีสุขอนามัยไม่ดี ดังจะเห็นได้จากรายงานของ WHO ในปี ค.ศ. 2011 ที่พบผู้ป่วยทั่วโลกเกือบ 600,000 ราย ซึ่งเสียชีวิตถึง 7,816 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.3 เมื่อเปรียบเทียบสถิติอัตราการตายของผู้ป่วยกับข้อมูลปี ค.ศ. 2010 พบว่าเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 3.5 (5) อย่างไรก็ตาม WHO คาดการณ์ว่า จำนวนที่ผู้ป่วยอหิวาตกโรคที่แท้จริงนั้นน่าจะสูงกว่าที่ได้รับรายงานมาก อาจจะเป็นเพียงร้อยละ 10 - 20 เท่านั้น (6) เนื่องจากพบว่ามีผู้ป่วยอีกประมาณ 500,00 - 700,000 รายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Acute watery diarrhea (2, 5)

หลังจากที่ได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกาย แบคทีเรีย *V. cholerae* มีกลไกในการก่อโรคหลายขั้นตอน เริ่มต้นจากการเรียงตัวกันเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm), การทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร (tolerance to gastric acidity), การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคโลไนเซชัน (colonization), การเกาะติดกับผนังลำไส้เล็ก (attachment), การหลั่งโปรตีนสารพิษ (cholera toxin secretion) (3, 4) แต่เนื่องจากเชื้อ *V. cholerae* นั้นจะไวต่อสภาวะกรด จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณเชื้อสูงเพื่อทำให้เกิดโรคท้องร่วงชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่น นอกจากนี้แบคทีเรียก็มีกลไกในการปรับตัวโดยจัดเรียงตัวเองให้เป็นไบโอฟิล์มเพื่อป้องกันอันตรายที่เกิดจากกรดในกระเพาะอาหารของคน (7, 8) และทำให้เชื้อรอดไปก่อพยาธิสภาพในลำไส้เล็ก

ด้วยการหลั่ง cholera toxin ต่อไป โปรตีนสารพิษชนิดนี้เป็นตัวการสำคัญทำให้เกิดการสูญเสียน้ำเฉียบพลัน โดยเมื่อเชื้อเกาะติดเซลล์เอนเทอโรไซต์ (enterocytes) โดยอาศัยโปรตีน toxin coregulated pilus (TCP) เชื้อจะหลั่ง cholera toxin ผ่านเข้าภายในเซลล์บุลำไส้เล็กแล้วจะกระตุ้นเอนไซม์อะดีนีลไซเคลส (adenyl cyclase หรือ AC) ส่งผลให้ระดับ cyclic AMP ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นและเกิดการขับน้ำและอิเลคโตรไลต์ (electrolytes) ปริมาณมากออกจากเซลล์ลำไส้เล็กอย่างรวดเร็วจนเกิด acute watery diarrhea ในที่สุด (1, 3, 4, 7) ที่สำคัญกว่านั้นเมื่อเชื้อ *V. cholerae* ถูกขับถ่ายออกจากร่างกายผู้ป่วยไปแล้ว ก็สามารถปนเปื้อนไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติและอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานาน ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่หลากหลายและเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาในสิ่งแวดล้อมของเชื้อ *V. cholerae* นั้นก็เนื่องมาจากการจัดเรียงตัวเป็นไบโอฟิล์มได้ทำให้เชื้อนั้นได้รับการปกป้องจากการเปลี่ยนแปลงภายนอกได้เป็นอย่างดี (7, 9) คุณสมบัตินี้เองจึงเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้โรคอหิวาตกโรคนั้นแพร่กระจายผ่านแหล่งน้ำธรรมชาติอย่างรวดเร็วและกว้างขวาง (9) ที่น่าสนใจกว่านั้นผลการวิจัยของ Faruquet และคณะพบว่าไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholerae* ที่ขับถ่ายออกมากับอุจจาระผู้ป่วยนั้นมีความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) สูงกว่าเชื้อที่เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอีกด้วย (10)

ดังนั้นกระบวนการจัดเรียงตัวกันเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholerae* นั้นจึงไม่เพียงแต่เป็นขั้นตอนสำคัญที่ส่งเสริมกระบวนการติดเชื้อในร่างกาย แต่ยังช่วยปกป้องเชื้อให้อาศัยในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนานและเอื้อต่อการแพร่ระบาดของโรคอีกด้วย การศึกษาทำความเข้าใจกลไกการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholerae* จะเป็นองค์ความรู้ที่จะช่วยให้สามารถหาวิธีหรือสารยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเพื่อป้องกันการติดเชื้อและการระบาดของโรคอหิวาตกโรคได้ จากการศึกษาพบว่าในเชื้อ *V. cholerae* มีระบบสัญญาณ (signaling system) เพื่อควบคุมการสร้างไบโอฟิล์ม 2 ระบบ ได้แก่ การใช้ควอรัมเซนซิง (quorum sensing) และระดับ 3′, 5′-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) (11) ซึ่งเมื่อทั้ง 2 ระบบถูกกระตุ้นก็จะส่งสัญญาณให้กับกลุ่มยีนใน *Vibrio* polysaccharide (VPS) operons แสดงออกและผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide synthesized enzymes) ผ่านการทำงานร่วมกันของตัวกระตุ้น VpsR (12, 13) และ VpsT (11, 12, 14) โดยโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ผลิตขึ้นก็จะถูกนำไปเป็นส่วนประกอบสำคัญของไบโอฟิล์ม ในปี ค.ศ. 2009 มีการค้นพบว่า สาร indole มีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของยีนของเชื้อ *V. cholerae* มากมายหลายยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง VPS (15) ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* เป็นต้น (16-19) indole เป็นหนึ่งในสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส (tryptophanase หรือ Trpase) ที่ย่อยสลายกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan หรือ Trp) ด้วยปฏิกิริยาเคมี α,β-elimination และ β-substitution (20) การศึกษาในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 พบว่าการใช้สารยับยั้ง (inhibitors) ต่อเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจะลดความสามารถในการจัดเรียงตัวเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อได้ (17) นอกจากนี้สารที่มีโครงสร้างคล้าย indole ก็มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและความรุนแรงของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด (21-26) ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* ควรจะได้รับการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีด้านต่าง ๆ เพื่อ

เป็นองค์ความรู้ที่จะใช้ในการค้นหา/ออกแบบสารยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ (27) เพื่อลดความรุนแรงของโรคอหิวาตกโรคและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อได้อีกด้วย

6.2) วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. โคลนนิ่ง, แสดงออกและแยกเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสของเชื้อ *V. cholerae* ให้บริสุทธิ์ โดยตัดต่อชิ้นยีน *tna*A ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) ลงในพลาสมิด pET-20b(+)
2. หาตำแหน่งกรดอะมิโนสำคัญใน active site ของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส ที่มีส่วนสำคัญในการทำปฏิกิริยากับซับสเตรทและโคแฟคเตอร์ PLP ด้วยการทำ site-directed mutagenesis
3. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสของเชื้อ *V. cholerae* กับซับสเตรทต่าง ๆ เช่น L-tryptophan, S-methyl-L-cysteine, S-benzyl-L-cysteine เป็นต้น

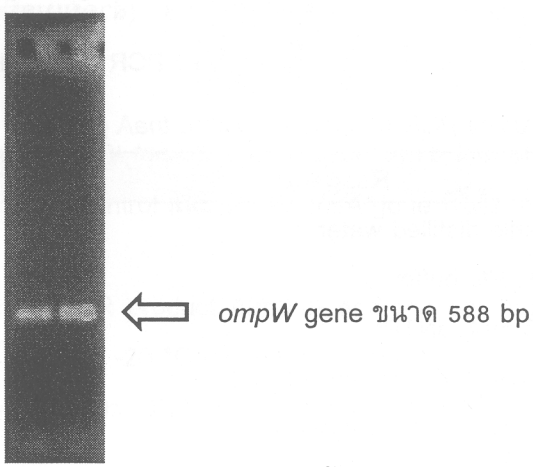
6.3) ระยะเวลาในการวิจัย 3 ปี (รวมระยะเวลาที่ได้รับการขยายเวลาการวิจัย)

6.4) แหล่งทุนสนับสนุน ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้ ม.สงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2553

6.5) ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

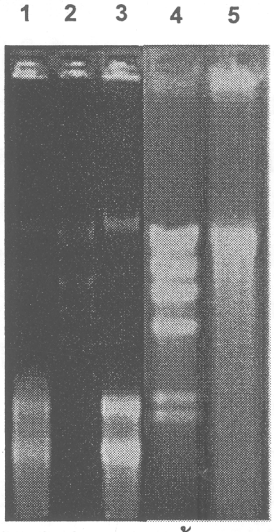
1) เชื้อแบคทีเรียที่ใช้และการสกัดโครโมโซม

โครงการวิจัยนี้จะแยก *tnaA* gene จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 (เป็น serogroup O1 ที่ก่อโรครุนแรงและแยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในคราวที่เกิดอหิวาตกโรคระบาดครั้งใหญ่ที่ประเทศบังกลาเทศ) ในเบื้องต้นได้พิสูจน์คุณลักษณะและยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี biochemical tests (ประกอบด้วย เลี้ยงบน TCBS agar ให้โคโลนีสีเหลือง และเลี้ยงบน Chrome agar ให้โคโลนีสีฟ้า-สีน้ำเงิน, ผล oxidase test ให้ผลบวก), วิธีการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยใช้ anti O1 antibody ของเชื้อ *V. cholerae* ให้ผลบวก, และนำเชื้อไปพิสูจน์ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *ompW* gene ของเชื้อ *V. cholerae* เท่านั้นก็พบ PCR product ที่มีขนาดตามต้องการ (588 คู่เบส) ดังรูปที่ 1 ซึ่งผลการทดสอบทั้งหมดก็สอดคล้องและยืนยันได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดลองนั้นคือ *V. cholerae*



รูปที่ 1 PCR products ของ *ompW* gene จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 ที่แสดงให้เห็นชิ้นยีนขนาด 588 bp

จากนั้นจึงสกัดโครโมโซมของเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 ด้วยวิธี phenol-chloroform (ดัดแปลงจากวิธีของ (28)) ให้ผลการสกัดไม่ดีเท่าที่ควร (ดังรูปที่ 2A) จึงใช้ชุดสกัดโครโมโซมสำเร็จรูป (DNA extraction GF-1, vivantis) จึงได้ผลโครโมโซมที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพ (ดังรูปที่ 2B)



รูปที่ 2 ผลการสกัดโครโมโซมของเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966 ด้วยวิธี phenol chloroform (A) และใช้ชุดสกัดโครโมโซมสำเร็จรูป (B)

2) การแยกและเพิ่มจำนวนยีน *tna*A จากโครโมโซมของเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) สำหรับการโคลนนิ่ง

นำโครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.1) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/μL ด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ต่อไปโดยใช้ primer 2 สาย คือ *tna*A-VC_F2 ที่มีลำดับเบสดังนี้ 5′ TACATATGGAAAATTTTAAACACTTACCAGAACC 3′) และ *tna*A-VC_R ที่มีลำดับเบสดังนี้ 5′ TTGTCGACGGCTTTTTCTTTTAAGCG 3′ (ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และ *Sal* I ตามลำดับ) ส่วนประกอบของ PCR มีดังต่อไปนี้

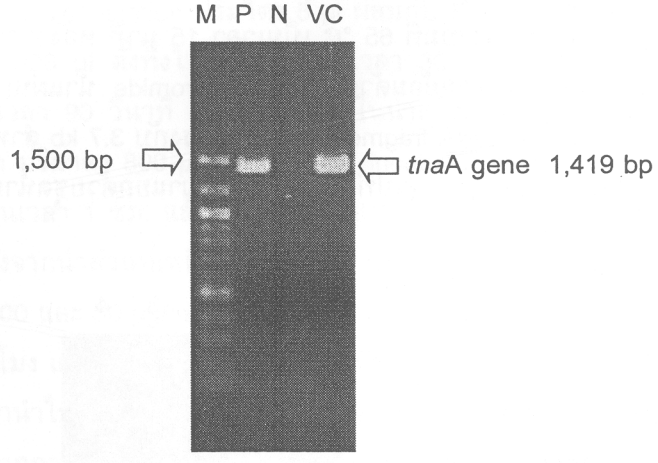
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ PCR สำหรับเพิ่มปริมาณ *tna*A gene

Reagent	ปริมาตร (μL)
sterile distilled water	14.9
10x *Pfu* buffer	2.0
2.5 mM dNTPs	1.0
10 mM primer *tna*A-VC_F2	0.4
10 mM primer *tna*A-VC_R	0.4
Pfu DNA polymerase (10 U/μL)	0.3
DNA template (10 ng/μL)	1.0
ปริมาตรรวม	20.0

ตารางที่ 2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณ *tna*A gene คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Pre-denaturation	95 °C	5 นาที	1
2. Denaturation	95 °C	45 วินาที	33
3. Annealing	53 °C	30 วินาที	
4. Extension	72 °C	2 นาที	
5. Final extension	72 °C	10 นาที	1

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ไปตรวจสอบหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.4 kb ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer โดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 90 โวลต์ เวลา 45 นาที ในการแยก DNA นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง ultraviolet (UV) ถ่ายภาพเก็บไว้ ดังจะเห็นได้ในรูปที่ 3 จะพบ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 1.4 kb ซึ่งตรงกับขนาดของยีน *tna*A ตัดเจลบริเวณดังกล่าวและนำมาแยกด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปโดยปฏิบัติตามคู่มือ



รูปที่ 3 PCR product ของยีน *tna*A ขนาดประมาณ 1.4 kb โดย M คือ DNA ladder, P คือ positive control, N คือ negative control และ VC คือ *tna*A gene ที่ได้จากเชื้อ *V. cholerae*

หลังจากนั้นสกัด *tna*A PCR product ออกจาก agarose gel ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป เมื่อสกัดเสร็จแล้วจึงนำไปเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอทำการทดลองต่อไป

3) การเตรียม DNA vector และ DNA insert สำหรับการโคลนนิ่งโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Sal* I

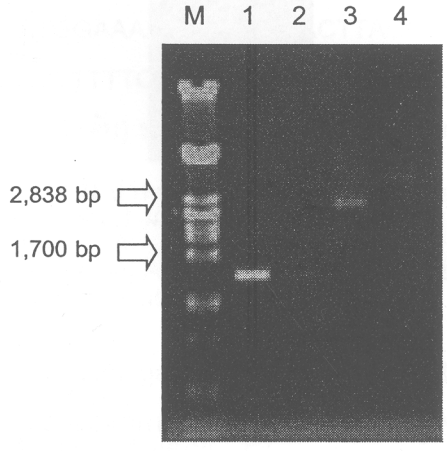
เลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ Novablue ที่บรรจุพลาสมิด pET-20b(+) บน LB agar ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 ug/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. เลือกโคโลนีเดี่ยวใส่ลงใน LB broth ที่มี ampicillin

ความเข้มข้น 100 ug/ml ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่า 150 รอบ/นาที นาน 16-18 ชม. จากนั้นสกัดพลาสมิด pET-20b(+) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปโดยปฏิบัติตามเอกสารประกอบ หลังจากนั้นนำทั้ง *tna*A PCR product (ที่ได้จากข้อ 2.2) และ pET-20b(+) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Sal* I โดยมีส่วนประกอบในปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3 ส่วนผสมสำหรับการตัดต่อ *tna*A gene เข้าสู่ pET-20b(+)

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
Deionized water	7.8
10X NE buffer 3	2
BSA	0.2
*Nde*I	0.1
*Sal*I	0.1
DNA (2 µg/ml)	10
ปริมาตรรวม	20

นำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบเวลานำไปหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide นำแผ่นเจลไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง ultraviolet และตัดเจลที่มี DNA fragment ที่มีขนาดตรงกับ 3.7 kb สำหรับ pET-20b(+) (รูปที่ 4 lane ที่ 3) และ 1.4 kb สำหรับ *tna*A gene (รูปที่ 3 lane ที่ 1) มาแยกด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปโดยปฏิบัติตามคู่มืออย่างเคร่งครัด



รูปที่ 4 การเตรียม pET-20b(+) plasmid vector และ *tna*A DNA insert; M = λ *Pst* I marker, 1 = *tna*A uncut, 2 = *Sal*I & *Nde*I-*digested-tna*A, 3 = pET-20b(+) uncut, 4 = *Sal*I & *Nde*I-*digested-* pET-20b(+)

4) การ Ligation และ การนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์โดยใช้เทคนิค heat shock transformation

นำ pET-20b (+) และ *tna*A gene ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Sal*I และแยกจากเจลแล้ว (จากข้อ 4.3) มาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase โดยมีส่วนผสมในการทำดังนี้

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ *tna*A gene เข้าสู่ pET-20b(+) vector

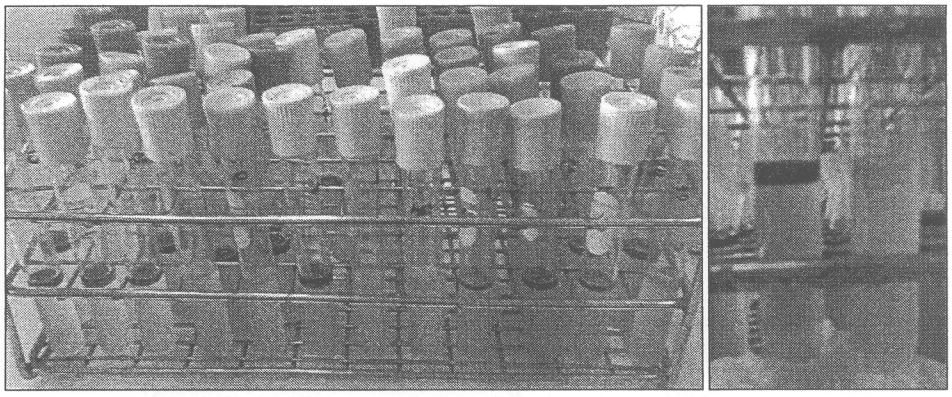
ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
Deionized water	9.0
10X Ligation buffer	2.0
pET-20b (+)	2.0
*tna*A gene	6.0
T4 ligase	1.0
ปริมาตรรวม	20.0

เมื่อผสมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลาอย่างน้อย 6-16 ชม. จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยการบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำ recombinant DNA ที่ได้จากการทำ ligation ปริมาตร 5 µl ผสมกับ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) *tn5:tna*A competent cells ปริมาตร 200 µl ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 42 °C ทันทีเป็นเวลา 90 วินาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-5 นาที เมื่อครบเวลาเติมอาหารเหลว SOC medium ปริมาตร 800 µl นำไปบ่มด้วย incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง 800 µl หลังจากนำส่วนที่เหลือมา spread บนอาหาร LB agar ที่ผสม ampicillin และ kanamycin ความเข้มข้น 100 และ 50 µg/mL ตามลำดับ โดย spread plate ละ 100 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง และนำโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นไปเลี้ยงต่อใน 1% peptone agar เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปทดสอบ indole เพื่อหา transformants ที่ให้ผลการทดสอบ indole เป็นบวก เนื่องจากมี indole จากการทำงานของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส (จาก tnaA gene บน recombinant plasmid) ในขณะที่ host cells (*E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) *tn5:tna*A) ที่ใช้นั้นเป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่ผ่านการกำจัด *tna*A gene ออกไปแล้วด้วยกระบวนการ transposon mutagenesis ทำให้เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่ให้ indole เป็นลบ (29, 30)

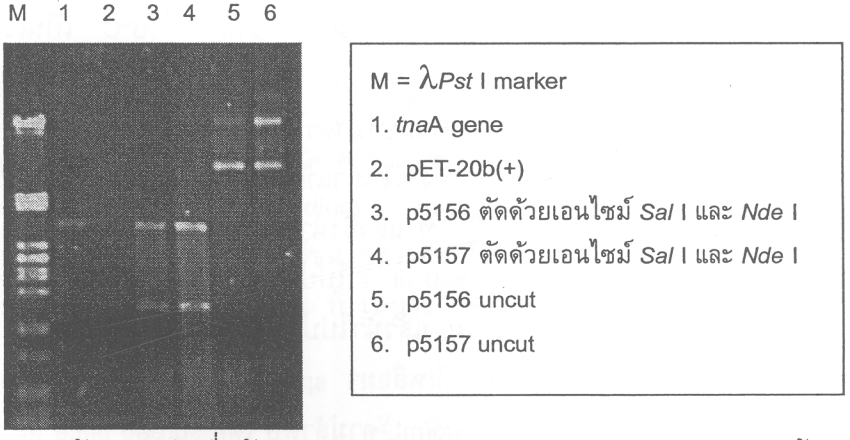
วิธีในการพิสูจน์ได้แก่

1. indole test; positive transformant จะให้ค่า indole เป็นบวก ดังรูปที่ 5

2. Restriction analysis: โดยการสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Sal*I ซึ่ง positive transformant จะให้ DNA fragments หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองเป็น 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 3.7 kb และ 1.4 kb สำหรับ pET-20b(+) vector และ *tna*A gene insert ตามลำดับ ดังรูปที่ 6



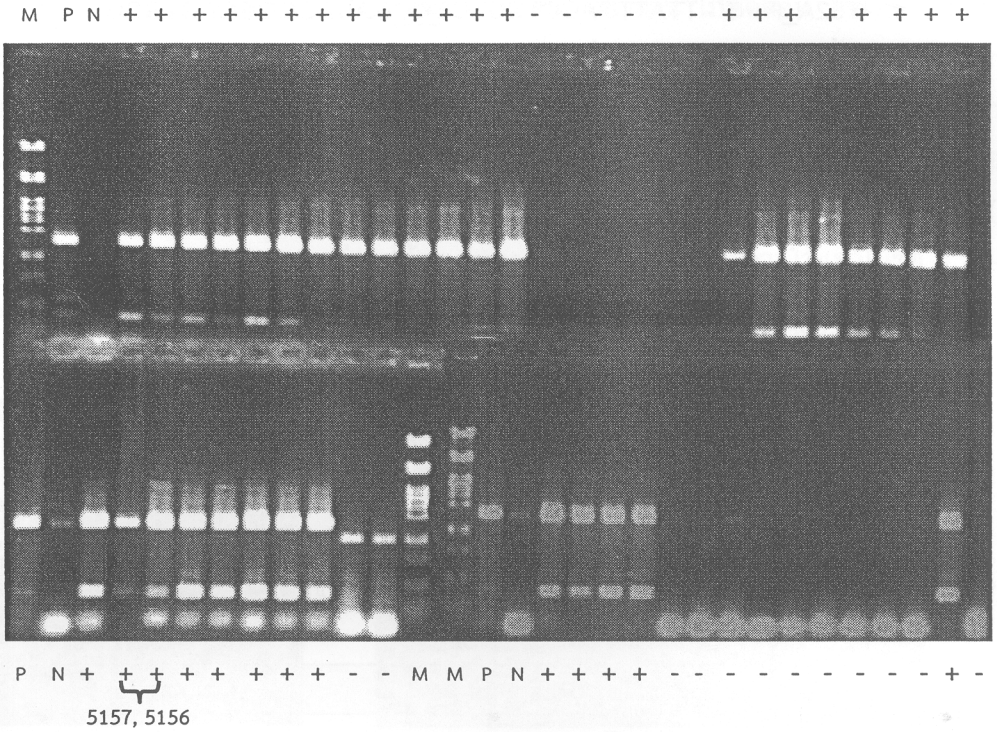
รูปที่ 5 ผลการทดสอบ indole test ในหลอดทดลอง พบว่าจาก 52 transformants มี 33 transformants ให้ผล Indole positive โดยใช้ *V. cholerae* เป็น positive control (สร้างเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจึงให้ indole positive) และใช้ *Klebsiella* sp. เป็น negative control (ไม่สร้างเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจึงให้ indole negative) ดังรูปเล็กด้านขวา



รูปที่ 6 ผลการตัดพลาสมิดที่สกัดจาก transformant หมายเลข 5156 และ 5157 ด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Sal*I

3. PCR amplification: โดยการสกัดพลาสมิดและใช้ primer *tna*A-VC_F2 และ *tna*A-VC_R ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ *tna*A gene จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU 966 เพื่อเพิ่มปริมาณ *tna*A gene และนำมาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ก็จะได้ PCR product ขนาด 1,419 bp ดังรูปที่ 7

4. DNA sequencing: หลังจากพิสูจน์ด้วยข้อที่ 1 ถึง 3 แล้ว จะพิสูจน์ขั้นสุดท้ายด้วย DNA sequencing เพื่อเป็นการยืนยันความสำเร็จและความถูกต้องของการโคลนนิ่ง ผลการทดสอบพบว่าการตัด/ต่อ *tna*A gene สำเร็จ โดยไม่มีข้อผิดพลาด *tna*A gene เชื่อมต่อกับ pET-20b(+) ได้ in-frame น่าจะสามารถแสดงออกโปรตีน Trpase ได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 7 ผล PCR amplification ของ *tna*A gene (ขนาด 1.4 Kb) จาก transformants โดย lane M = standard DNA marker, P = positive control (โครโมโซมของเชื้อ *V. cholerae*), N = negative control (pET-20b(+)), + = *tna*A gene positive, - = *tna*A gene negative

5) การเปลี่ยนกรดอะมิโนเฉพาะตำแหน่งของยีน *tna*A ด้วยวิธี site-directed mutagenesis

จากการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* กับโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จากเชื้อ *E. coli* และ *P. vulgaris* ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่ามีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ 5 ตำแหน่งได้แก่ Thr52, Arg103, Asp137, Arg230 และ Arg419 จึงทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนดังกล่าวทั้งหมดให้เป็น Ala (อะลานีน) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นกลางและไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ วิธีที่ใช้ได้แก่ PCR-based site-directed mutagenesis ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกับ PCR ทั่วไปแต่มีข้อแตกต่างคือจะใช้ mutagenic primer ที่มี codon สำหรับเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ต้องการ และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชื่อ *DpnI* ที่มีคุณสมบัติในการย่อยทำลายสาย methylated DNA strand แต่จะไม่สามารถย่อยสาย DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ในหลอดทดลอง กระบวนการทั้งหมดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ใช้ pET-20b(+)_TnaA-VC ซึ่งมี *tna*A gene ของเชื้อ *V. cholerae* (ได้มาจากการตัดต่อยีนในรายงานความก้าวหน้าครั้งก่อน) เป็น template นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 ng/µl ด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนและเปลี่ยนกรดอะมิโนในคราวเดียวกัน โดยใช้ mutagenic primers 5 ชนิด คือ

1. T52A_F 5′- TTATTGACCTGCTC**GCC**GACAGCGGCACTGGC - 3′
   T52A_R 5′- GCCAGTGCCGCTGT**CGG**CGAGCAGGTCAATAA - 3′
2. R103A_F 5′ - CCGACCCACCAAGGT**GCG**GGTGCAGAGCAGATT - 3′
   R103A_R 5′ - ATTCTGCTCTGCACC**CGC**ACCTTGGTGGGTCGG - 3′
3. D137A_F 5′ - CTAACTACTTTTT**CGC**CACCACTCAAGGCC - 3′
   D137A_R 5′ - GGCCTTGAGTGGTG**GCG**AAAAAGTAGTTAG - 3′
4. R230A_F (5'CATGGACTCTGCT**GCG**TTTGCTGAAAATGCG3')
   R230A_R (5'CGCATTTTCAGCAAA**CGC**AGCAGAGTCCATG3')
5. R419A_F 5′ - CCAGCCGAATTGCTC**GCG**TTAACCATTCCACGC - 3′
   R419A_R 5′ - GCGTGGAATGGTTAA**CGC**GAGCAATTCGCGTGG - 3′

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบ site-directed mutagenesis PCR ของ *tna*A gene ปริมาตรรวม 20 µL

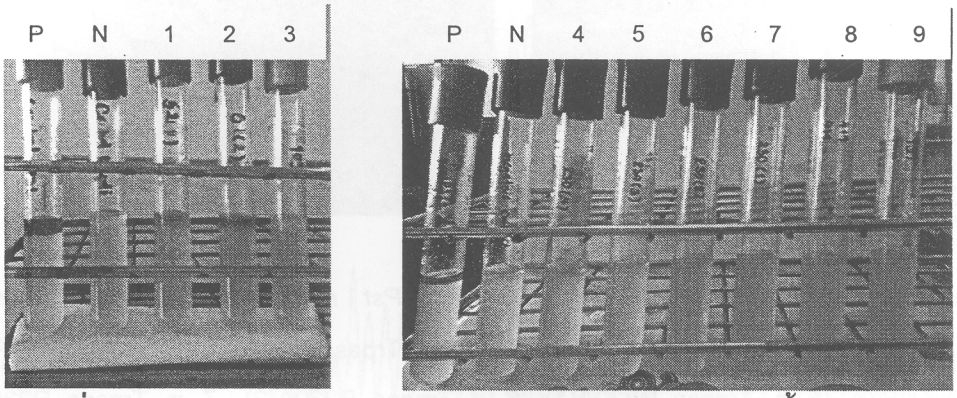
Reagent	ปริมาตร (µL)
10x *Pfu* buffer	2.0
2.5 mM dNTPs	1.0
10 µM primer	0.4
Pfu DNA polymerase (2.5 U/µl)	0.4
Plasmid template (1 ng/µl)	15.8
ปริมาตรรวม	20.0

ตารางที่ 6 สภาวะการทำปฏิกิริยา site-directed mutagenesis PCR ของ *tna*A gene

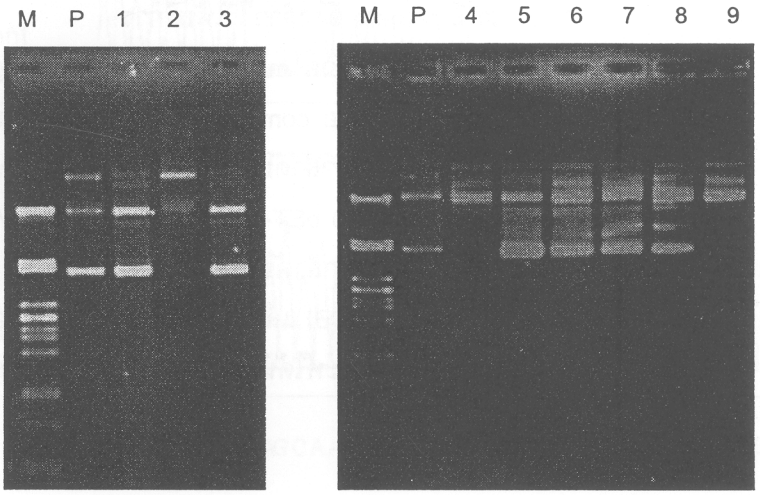
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	95 °C	2 นาที	1
2. Denature	95 °C	30 วินาที	16
3. Annealing	55 °C	1 นาที	
4. Extension	72 °C	4 นาที	
5. Final extension	72 °C	10 นาที	1

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์แล้วเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dpn*I 1U/µL ลงไปเพื่อย่อยสลายดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่มีมิวเตชัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการให้บ่มที่ 80 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ digested PCR product เข้าสู่เซลล์ *E. coli* competent cell ด้วยวิธี heat shock transformation ตามรายละเอียดข้อ 4.4 และนำโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นไปเลี้ยงต่อใน 1%

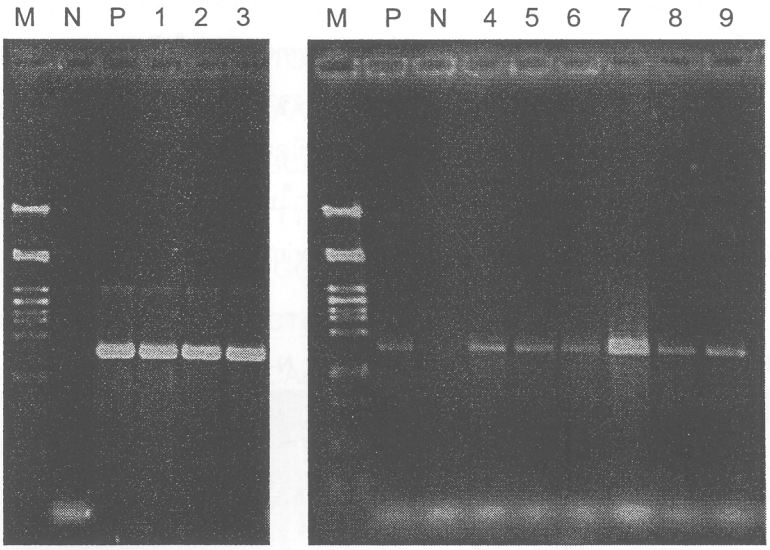
peptone agar เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อจนครบเวลานำไปทดสอบ indole เพื่อคัดกรองหาแบคทีเรียที่น่าจะแสดงออก mutant Trpase enzyme ที่ควรให้ผลการทดสอบ indole เป็นลบ (negative) หรือ บวกเล็กน้อย (weakly positive) เนื่องจากกรดอะมิโนสำคัญของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสนั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปดังรูปที่ 8 หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียที่ให้ผล indole negative (หรือ weakly positive) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปดังรูปที่ 9 เพื่อนำไปยืนยันว่ามียังคงมียีน *tna*A อยู่ใน pET-20b(+) พลาสมิดเวคเตอร์ด้วย PCR amplification ต่อไปด้วย primer และสภาวะที่เคยกล่าวไว้แล้วในข้อ 4.2 ผลที่ได้ดังรูปที่ 10



รูปที่ 8 การทดสอบ indole P = wild type Trpase, N= host cell เชื้อ *E. coli* BL21(DE3) tn5:*tna*A, 1= Trpase_T52A (1) mutant, 2= Trpase_T52A (2) mutant, 3 = Trpase_R103A mutant, 4= Trpase_R230A (1) mutant, 5= Trpase_R230A (2) mutant, 6 = Trpase_R230A (3) mutant, 7 = Trpase_R230A (4) mutant, 8 = Trpase_R419A mutant และ 9 = Trpase_D137A mutant



รูปที่ 9 Agarose gel electrophoresis ของการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป M =λ *Pst* I marker, **P** = wild type Trpase, **1** = Trpase_T52A (1) mutant, **2** = Trpase_T52A (2) mutant, **3** = Trpase_R103A mutant, **4** = Trpase_D137A mutant, **5** = Trpase_R230A (1) mutant, **6** = Trpase_R230A (2) mutant, **7** = Trpase_R230A (3) mutant, **8** = Trpase_R230A (4) mutant และ **9** = Trpase_R419A mutant



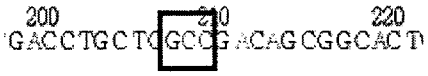
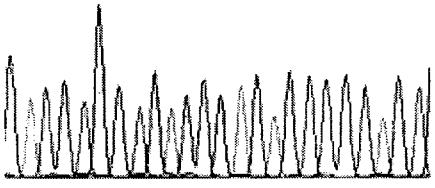
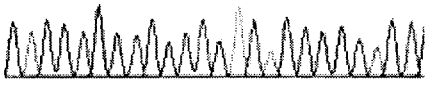
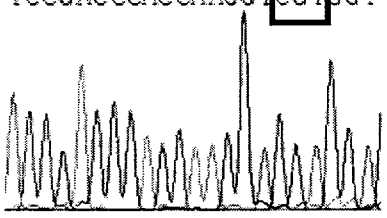
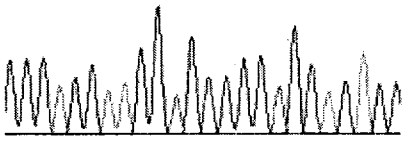
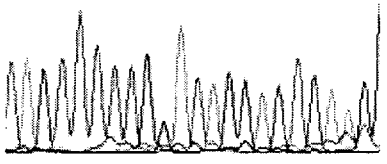
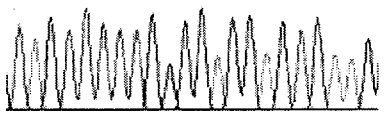
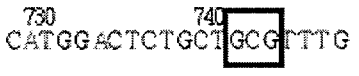
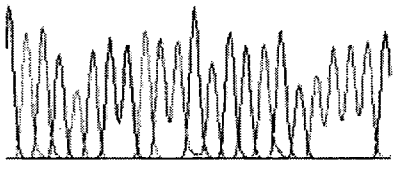
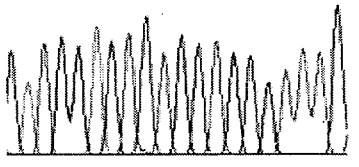
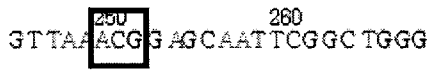
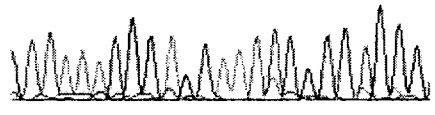
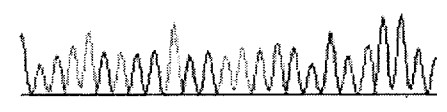
รูปที่ 10 PCR amplification ยีน *tna*A gene M =λ*Pst* I marker, P = wild type Trpase, N = *E.coli* BL21(DE3) tn5:*tna*A, 1= Trpase_T52A(1), 2 = Trpase_T52A(2), 3 = Trpase_R103A, 4 = Trpase_D137A, 5 = Trpase_R230A(1), 6 = Trpase_R230A(2), 7 = Trpase_R230A(3), 8 = Trpase_R230A(4) และ 9 = Trpase_R419A

จากนั้นจึงนำทั้งหมดไปหาลำดับเบส เนื่องจากใน plasmid vector ที่ใช้มีส่วนประกอบของ T7 promoter และ T7 terminator อยู่ จึงสามารถใช้ primers ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนทั้งสองในการหาลำดับเบสได้ ซึ่งบริษัทที่ให้บริการหาลำดับเบสก็มี primers ดังกล่าวไว้ให้บริการ

นำ transformants ที่ผ่านการพิสูจน์ด้วย indole แล้วให้ผลเป็น negative หรือ weakly positive และพบ *tna*A gene ด้วยมาสกัด plasmid ด้วย commercial kit จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol และส่งตัวอย่าง mutant plasmid ไปหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ด้วยการใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วน T7 promoter และ T7 terminator ของ pET-20b(+) plasmid แล้ว พบว่าตัวอย่างพลาสมิดทั้งหมดสามารถอ่านลำดับเบสได้เป็นอย่างดี และได้นำลำดับเบสของ *tna*A gene เปรียบเทียบกับข้อมูล gene ดังกล่าวในเชื้อ *V. cholerae* จากฐานข้อมูล NCBI แล้วพบว่าเหมือนกัน 100%

นอกจากนี้ Trpase mutants ที่สังเคราะห์ได้นั้นก็ผ่านการยืนยันลำดับเบสแล้ว ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงลำดับเบสของ wild type *tna*A gene และ mutants ตำแหน่งต่าง ๆ

Trpase mutants	**ลำดับเบสของ wild type *tna*A gene**	**ลำดับเบสของ mutated *tna*A gene**
Trpase-VC_T52A (ACC --> GCC)		
Result: Correct mutant		
Trpase-VC_R103A (CGT --> GCG)		
Result: Correct mutant		
Trpase-VC_D137A (GAT --> GCC)		
Result: Correct mutant		
Trpase-VC_R230A (CGT --> GCG)		
Result: Correct mutant		
Trpase-VC_R419A (ACG --> CGC)		
Result: Incorrect mutant		

จากผลการพิสูจน์ลำดับเบสในตารางที่ 7 พบว่า VcTrpase mutants ที่มีลำดับเบสถูกต้องได้แก่ VcTrpase_T52A, VcTrpase_R103A, VcTrpase_D137A, และ VcTrpase_R230A แต่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 419 นั้นได้ลำดับเบสที่ไม่ถูกต้อง (ได้เป็น R419V substitution แทนที่ R419A substitution) ดังนั้นจะนำ VcTrpase mutants ที่ถูกต้องเท่านั้นไปแสดงออก, ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

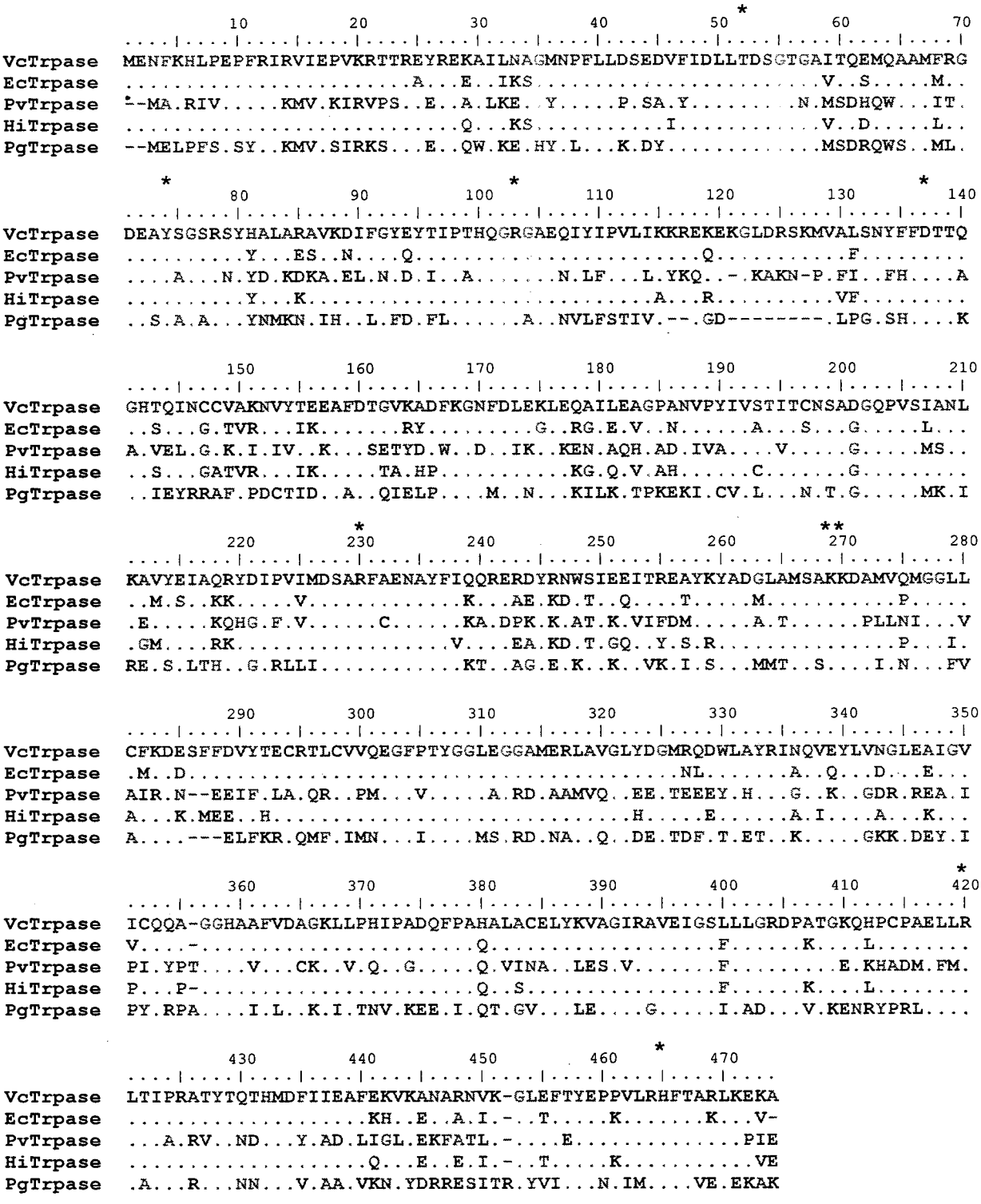
6) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* กับเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด

จากผลการยืนยันลำดับเบสของ *tna*A gene จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 จึงได้นำลำดับเบสดังกล่าวแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนและนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของเอนไซม์จากเว็บไซต์ http://web.expasy.org/compute_pi/ (31) ได้ผลดังว่า เอนไซม์ทริปโตเฟนเนสของ *V. cholerae* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 52.98 kDa และมีค่า pI ประมาณ 5.71 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่ามีความแตกต่างกันพอสมควร ดังตารางที่ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสของเชื้อ *V. cholerae* มีลักษณะคล้ายคลึงกับของเชื้อ *E. coli* และ *H. influenzae* มาก โดยมีกรดอะมิโนเหมือนกันถึงระ 84-85% ในขณะที่เอนไซม์ของเชื้อ *P. vulgaris* และ *P. gingivalis* นี้มีกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์ของเชื้อ *V. cholerae* เพียงประมาณ 50% เท่านั้น

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* กับเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดอื่น

แบคทีเรีย	ค่า identities (%)	ค่า similarities (%)	แหล่งอ้างอิง
Trpase จาก *V. cholerae*	100%	100%	การศึกษาครั้งนี้
Trpase จาก *E. coli*	85%	92%	(32)
Trpase จาก *P. vulgaris*	52%	69%	(33)
Trpase จาก *H. influenzae*	84%	90%	(34)
Trpase จาก *P. gingivalis*	47%	63%	(35)

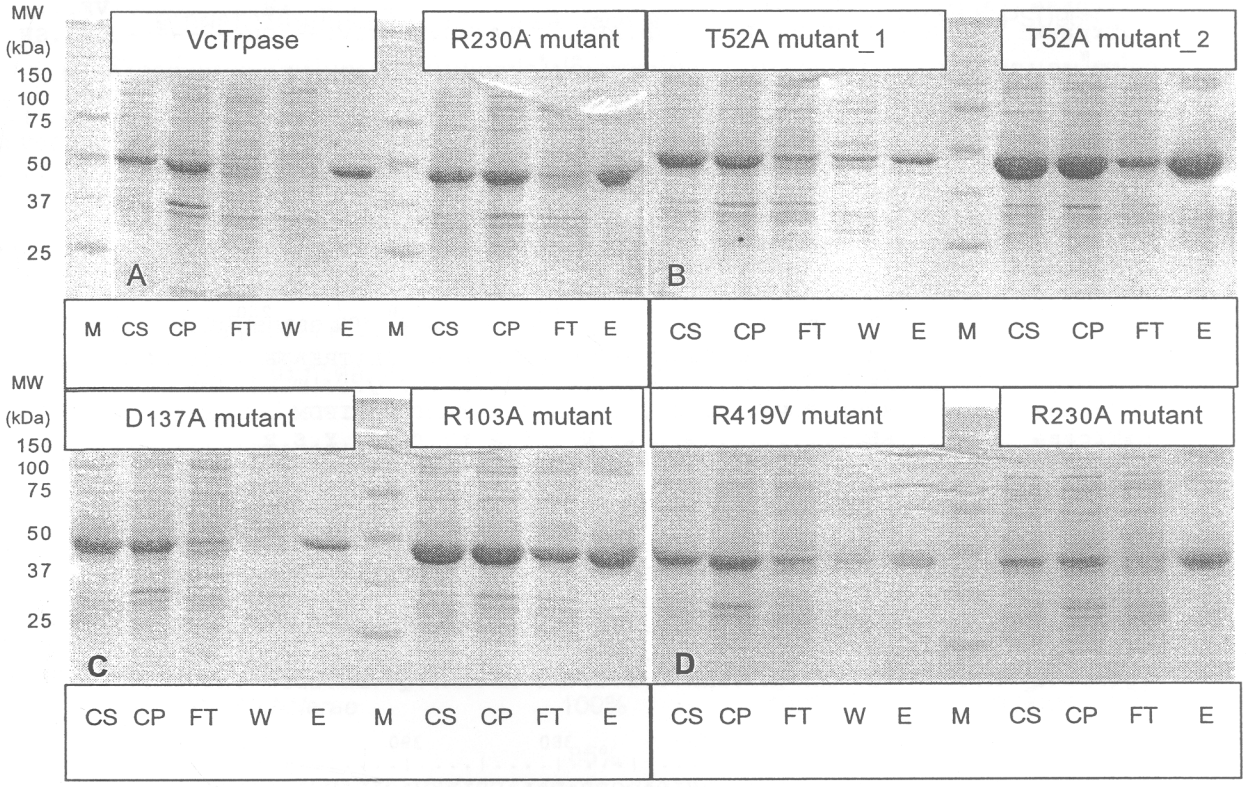
ในรูปที่ 11 แสดงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสของเชื้อ *V. cholerae* เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น จะเห็นได้ว่าตำแหน่งกรดอะมิโนที่พบว่ามีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสนั้นจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง (conserved residues) (36, 37) ก็ยังพบว่าเป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกันในเอนไซม์จากเชื้อ *V. cholerae* (ที่มีเครื่องหมาย *) บ่งบอกว่ากรดอะมิโนดังกล่าวน่าจะมีคุณสมบัติทางเคมีเหมาะสมและมีส่วนสำคัญมากสำหรับการย่อยซับสเตรท L-tryptophan เพื่อสร้าง indole ให้กับเชื้อ



รูปที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* กับเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วอีก 4 ชนิด กรดอะมิโนตำแหน่งที่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาถูกติดฉลากด้วยเครื่องหมาย * ได้แก่ Thr52, Tyr74, Arg103, Asp137, Arg230, Lys269, Lys270, Arg419, และ His463 (ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์จากเชื้อ *E. coli*)

7) การแสดงออกและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+}-NTA affinity chromatography

เนื่องจากใน expression vector ในการวิจัยนี้มี Hexahistidine tag ที่จับได้กับ metal ions หลายชนิดได้อย่างแน่นหนา จึงสามารถใช้ Ni^{2+}-NTA IMAC ในขั้นตอนทำให้ VcTrpase บริสุทธิ์ได้ โดยใช้ gradient imidazole ความเข้มข้นช่วง 10 ถึง 400 mM สำหรับการชะ VcTrpase ออกมาจากคอลัมภ์ จากนั้นนำ fractions ต่าง ๆ ไปวัดปริมาณโปรตีนและตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ได้ผลดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงผลการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+}-NTA affinity chromatography ของ wild type VcTrpase (รูป ที่ 12A), R230A mutant (รูปที่ 12A), T52A mutant (รูปที่ 12B), D137A mutant (รูปที่ 12C), R103A mutant (รูปที่ 12C). R419V mutant (รูปที่ 12D) และ R230A mutant (รูปที่ 12D) (โดยที่ M = MW markers, CS = crude supernatant, CP = crude pellet, FT = flow through, W = wash และ E = Eluted fractions)

จากรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้สามารถทำให้เอนไซม์ VcTrpase สามารถแสดงออกได้ดีมาก ดังจะเห็นได้จากการพบโปรตีนขนาดประมาณ 50 kDa เป็น major band ในส่วน crude supernatant (รูปที่ 12 lane CS) แต่ยังคงพบโปรตีน band ดังกล่าวในส่วน pellet (รูปที่ 12 lane CP) หลังจากการทำให้เซลล์แตกแล้วแสดงว่ากระบวนการ sonication ที่ใช้นั้นอาจจะไม่สามารถทำให้เซลล์แตกได้หมด จึงยังคงเป็นโปรตีนนี้อยู่ หรืออีกสาเหตุที่เป็นไปได้คือการ overexpression โปรตีนชนิดนี้ส่งผลให้เกิดการตกตะกอน

ทำให้ไม่ละลายน้ำ และไปรวมอยู่กับ cell pellet ได้ แต่อย่างไรก็ได้หลังจากการ washing และ elution แล้ว ก็ได้โปรตีน VcTrpase ที่บริสุทธิ์ (รูปที่ 12 lane E)

8) การวัดความเข้มข้นโปรตีน, ระดับ Trpase activity และค่า kinetics

ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีในการวัดปริมาณโปรตีน 2 วิธีคือ Bradford dye-binding assay สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนของ crude supernatant, crude pellet, flow through, และ wash และการวัดโดยอาศัยความสามารถในการดูดกลืนแสงของ Trpase ที่ความยาวคลื่น 278 nm นำมาเทียบกับสูตร $A^{1\%}_{1cm} = 9.19$ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ Trpase ในส่วน eluted fractions (หรือ purified Trpase) หลังจากนั้นจึงนำ fractions ต่าง ๆ มาตรวจหาระดับ Trpase activity ด้วยปฏิกิริยาอาศัย LDH-coupled reaction ที่ติดตามการลดลงของ NADH cofactor ที่ความยาวคลื่น 340 nm (38,Zakomirdina, 2002 #21) ได้ผลตามตารางที่ 9

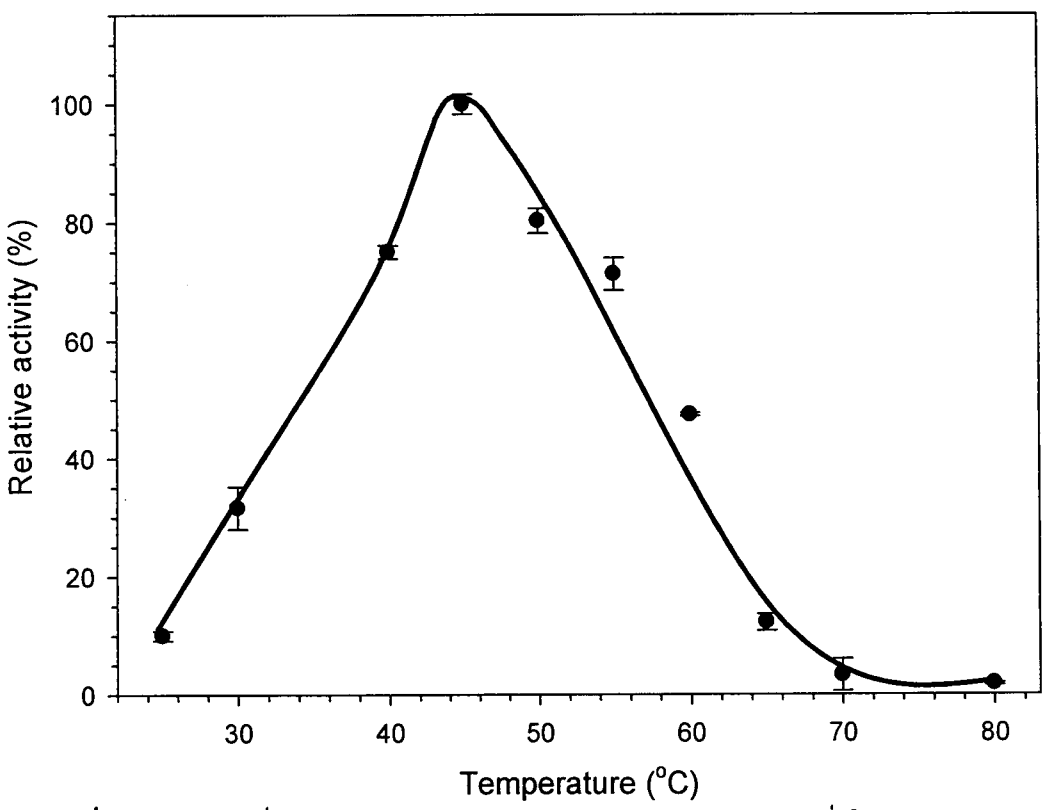
ตารางที่ 9 ผลการทำโปรตีน VcTrpase ให้บริสุทธิ์และระดับ Trpase activity ของ VcTrpase mutants

VcTrpase protein	ความเข้มข้น (mg/mL)	Specific Trpase activity (unit/mg protein)
Wild type VcTrpase	15.56	3.04
VcTrpase_T52A	38.52	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_Y74A	6.79	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_R103A	24.81	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_D137A	26.01	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_R230A	16.75	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_K269A	1.49	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_K270A	1.25	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_R419V	25.14	ไม่สามารถตรวจวัดได้
VcTrpase_H463A	3.49	0.126

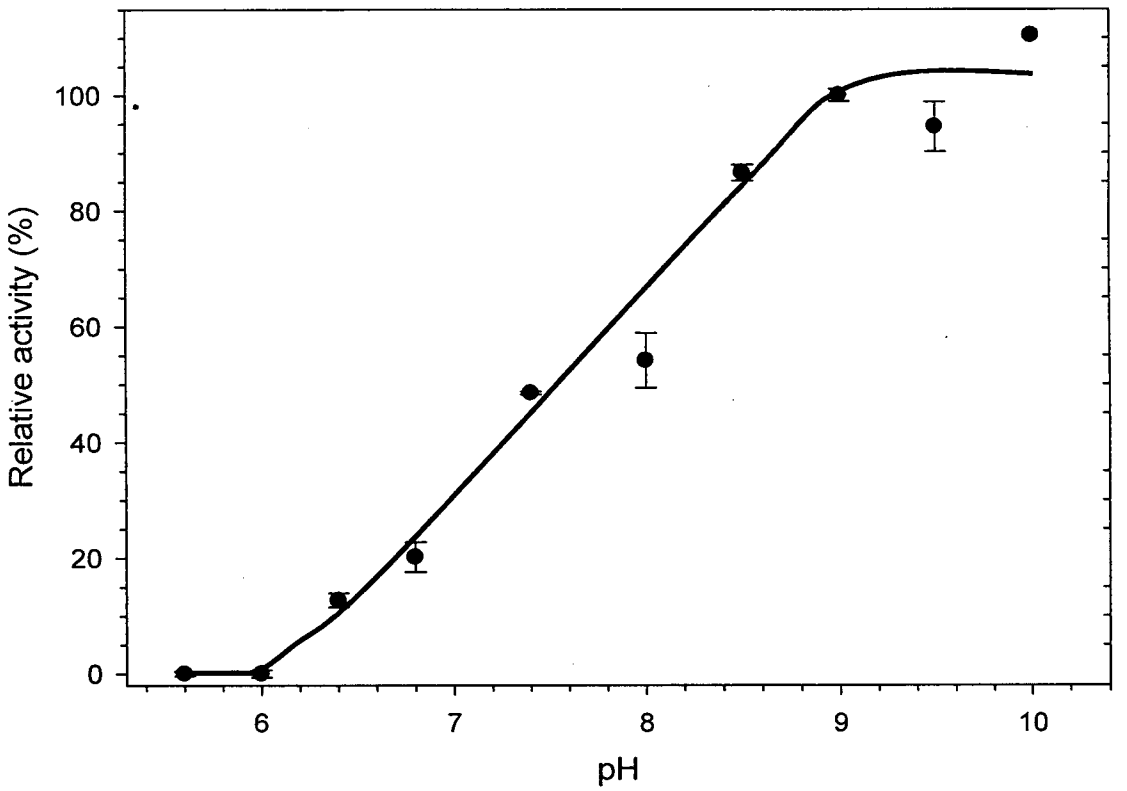
จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ชัดเจนว่า wild type VcTrpase ที่ clone มาจากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 ในโครงการวิจัยครั้งนี้นั้นสามารถแสดงออกและเร่งปฏิกิริยา β-elimination ได้ และ wild type VcTrpase ที่สกัดได้นั้นมีค่า specific Trpase activity 3.04 U/mg protein ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นที่สกัด Trpase จากแบคทีเรียอื่น (ประมาณ 3 – 9 U/mg protein) (29, 39-41) ส่วน mutants ตัวอื่น ๆ นั้นตรวจไม่พบ activity เลย ยกเว้น H463 mutant ซึ่งพบ activity ลดลงถึง 24 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type Trpase เป็นเพราะตำแหน่งกรดอะมิโนที่ถูกเลือกมาศึกษานั้น เป็นตำแหน่งที่พบว่ามีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทั้งหมด เช่น เกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยากับ substrate หรือทำปฏิกิริยากับ PLP cofactor

เป็นต้น (36, 37, 42) เมื่อกรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน Alanine แล้วไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แม้ยังไม่มีโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนนี้ ผลการทดลองนี้จึงเป็นข้อพิสูจน์ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญของเอนไซม์ Trpase จากเชื้อ *V. cholerae* ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาสร้าง indole เพื่อใช้ indole ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ ที่อาจจะใช้เป็นตำแหน่งเป้าหมายสำหรับออกแบบหรือค้นหาสารยับยั้งที่จะส่งผลในการลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคร้ายแรงนี้ได้ในอนาคต (27)

เมื่อนำ purified VcTrpase มาทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาพบว่าเอนไซม์ VcTrpase นั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 ^{o}C (ดังรูปที่ 13) และที่ pH 9.0 (ดังรูปที่ 14) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่แตกต่างกับเอนไซม์ Trpase ที่พบในแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (29, 35, 41)



รูปที่ 13 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ VcTrpase เมื่อใช้ L-tryptophan เป็นซับสเตรท



รูปที่ 14 pH ที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ VcTrpase เมื่อใช้ L-tryptophan เป็นซับสเตรท

เมื่อนำมาทดสอบหาค่า kinetics ของ VcTrpase ที่สกัดได้ในการวิจัยนี้กับ L-tryptophan ซึ่งเป็นซับสเตรทตามธรรมชาติ พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 0.612 mM และค่า k_{cat} เท่ากับ 5.252 s^{-1} ดังตารางที่ 10 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ Trpase จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น *E. coli* (40, 43, 44), *P. vulgaris* (20), *P. gingivalis* (35), หรือ *P. profundum* (29) และเช่นเดียวกับซับสเตรทอีก 2 ชนิดคือ S-methyl-L-cysteine และ S-benzyl-L-cysteine ซึ่งจากค่า K_m จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ VcTrpase นั้นจะทำปฏิกิริยากับซับสเตรท S-benzyl-L-cysteine ได้ดีกว่า S-methyl-L-cysteine ก็น่าจะมาจาก S-benzyl-L-cysteine นั้นมีโครงสร้าง aromatic ring คล้ายกับซับสเตรทธรรมชาติ (L-tryptophan) มากกว่า S-methyl-L-cysteine ที่มีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาว แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่าง VcTrpase กับซับสเตรท L-serine และ L-phenylalanine ได้

ตารางที่ 10 ค่า kinetics ของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* PSU966

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s-1)	K_{cat}/K_m (M^{-1} s^{-1})
L-tryptophan	0.612	5.252	8.582×10^3
S-methyl-L-cysteine	30.145	0.490	0.016×10^3
S-benzyl-L-cysteine	0.210	0.346	1.648×10^3

ไม่สามารถวัดปฏิกิริยาได้เมื่อทดสอบโดยใช้ L-serine และ L-phenylalanine เป็นซับสเตรท

6.6) สรุปผลการทดลองและการอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการ cloning ยีนในการสร้างเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 ที่แยกได้จากผู้ป่วยอหิวาตกโรคในประเทศบังกลาเทศ โดยตัดต่อลง pET20b(+) plasmid vector ที่มี His6 tag ที่ปลายด้าน C-terminus ของโปรตีน การตัดต่อยีนครั้งนี้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องหลายวิธี ได้แก่ การทดสอบ indole test (รูปที่ 5) , การตัด recombinant plasmid ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Sal*I (รูปที่ 6), การเพิ่มปริมาณ *tna*A gene ด้วยวิธี PCR (รูปที่ 7), และการหาลำดับเบส (DNA sequencing) (ตารางที่ 7) ผลการทดสอบทั้งหมดยืนยันว่าการตัดต่อยีนครั้งนี้สำเร็จ และทราบลำดับเบสของ *tna*A gene จากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ PSU966 เมื่อนำกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae* นี้ (472 กรดอะมิโน) เปรียบเทียบกับเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่า มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์จากเชื้อ *E. coli* และ *H. influenzae* (85% และ 84% identities ตามลำดับ) (32, 34) ในขณะที่มีความเหมือนกับเอนไซม์จากเชื้อ *P. vulgaris* และ *P. gingivalis* เพียง 53% และ 47% ตามลำดับ (33, 35) แสดงให้เห็นถึงว่าเอนไซม์นี้อาจจะมีต้นกำเนิดและมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ *E. coli* และ *H. influenzae* มากกว่า อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบนี้ในรูปที่ 11 พบว่า กรดอะมิโนที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาสร้าง indole ของเอนไซม์จากแบคทีเรียทุกชนิดนั่นไม่มีการเปลี่ยนแปลง (อ้างอิงจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *E. coli* และ *P. vulgaris* .ในเอกสารอ้างอิง (36, 37))

จากนั้นนำมาแสดงออกและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Ni^{2+}-NTA chromatography จนได้เอนไซม์ VcTrpase (เอนไซม์ทริปโตเฟนเนสจากเชื้อ *V. cholerae*) ที่บริสุทธิ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa (รูปที่ 12) สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้อยู่ที่อุณหภูมิ 45 ^{o}C และ pH 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษาก่อนหน้านี้ (29, 35, 41) ยกเว้นเอนไซม์จากเชื้อ *Symbiobacterium thermophilum* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทนความร้อน อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่อุณหภูมิสูงจึงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 75 ^{o}C และคงทนต่อความร้อนได้ถึง 90 ^{o}C (38, 45) คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย L-tryptophan เพื่อสร้าง indole ของเอนไซม์นี้พบว่ามีค่า K_m = 0.612 mM และ k_{cat} = 5.252 s^{-1} และค่า K_m, k_{cat} กับซับสเตรท S-methyl-L-cysteine และ S-benzyl-L-cysteine มีค่า 30.145 mM, 0.490 s^{-1} และ 0.210 mM, 0.346 s^{-1} ตามลำดับ (ดังตารางที่ 10) เนื่องจากค่า kinetics ดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ Trpase จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (20, 29, 40, 43, 44) จึงสะท้อนให้เห็นถึงคุณสมบัติของ active site ของเอนไซม์ที่คล้ายคลึงกัน ผลการทดลองนี้ก็ช่วยยืนยันถึงการอนุรักษ์กรดอะมิโนที่สำคัญในบริเวณ active site ของเอนไซม์ไว้อย่างสมบูรณ์ 100% ดังที่เห็นในรูปที่ 11

ในขณะเดียวกันงานวิจัยครั้งนี้ก็ใช้เทคนิค site-directed mutagenesis เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาย่อย L-tryptophan เกิดเป็น indole จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ Thr52, Tyr74, Arg103, Asp137, Arg230, Lys269, Lys270, Arg419, และ His463 และพบว่าทำให้ไม่สามารถตรวจพบ Trpase activity ใน VcTrpase เหล่านี้ได้เลยหรือมี Trpase activity ลดลงกว่า 24 เท่า

ใน VcTrpase_H463A mutant (ดังตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งกรดอะมิโนเหล่านี้สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส สามารถเป็นตำแหน่งเป้าหมายสำหรับการออกแบบหรือค้นหาสารยับยั้งเพื่อรบกวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholerae* ได้ในอนาคต (27) ดังจะเห็นได้จากสารอนุพันธุ์ของ indole หลายชนิด เช่น 3-indolylacetonitrile (24), indole-3-acetaldehyde (25), 7-hydroxyindole (22) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและลดความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* เป็นต้น

6.7) เอกสารอ้างอิง

1. Sánchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. Current Opinion in Immunology. 2005;17(4):388-98.
2. World Health Organization. Cholera. 2012 [updated July 2012; cited 2013 October, 2nd]; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/index.html.
3. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. The Lancet. 2012;379(9835):2466-76.
4. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. The Lancet. 2004;363(9404):223-33.
5. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO): Cholera. 2013 [cited 2013 October 2nd]; Available from: http://www.who.int/gho/epidemic_diseases/cholera/en/index.html.
6. Svennerholm A-M, Steele D. Progress in enteric vaccine development. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2004;18(2):421-45.
7. Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. Trends in microbiology. 2009;17(3):109-18.
8. Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. Developmental Cell. 2003;5(4):647-56.
9. Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. Current Opinion in Biotechnology. 2008;19(3):244-7.
10. Faruque SM, Biswas K, Udden SMN, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, et al. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006;103(16):6350-5.
11. Waters CM, Lu W, Rabinowitz JD, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of vpsT. Journal of Bacteriology. 2008;190(7):2527-36.

12. Beyhan S, Bilecen K, Salama SR, Casper-Lindley C, Yildiz FH. Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR. Journal of Bacteriology. 2007;189(2):388-402.
13. Yildiz FH, Dolganov NA, Schoolnik GK. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPS^{ETr}-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Journal of Bacteriology. 2001;183(5):1716-26.
14. Krasteva PV, Fong JCN, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MVAS, Yildiz FH, et al. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. Science. 2010;327(5967):866-8.
15. Mueller RS, Beyhan S, Saini SG, Yildiz FH, Bartlett DH. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology. 2009;191(11):3504-16.
16. Collet A, Vilain S, Cosette P, Junter G, Jouenne T, Phillips R, et al. Protein expression in *Escherichia coli* S17-1 biofilms: impact of indole. Antonie van Leeuwenhoek. 2007;91(1):71-85.
17. Di Martino P, Fursy R, Bret L, Sundararaju B, Phillips RS. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. Canadian Journal of Microbiology. 2003;49(7):443-9.
18. Kuczyńska-Wiśnik D, Matuszewska E, Furmanek-Blaszk B, Leszczyńska D, Grudowska A, Szczepaniak P, et al. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling. Research in Microbiology. 2010;161(10):847-53.
19. Lee J, Jayaraman A, Wood T. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. BMC Microbiology. 2007;7(1):42.
20. Zakomirdina LN, Kulikova VV, Gogoleva OI, Dementieva IS, Faleev NG, Demidkina TV. Tryptophan indole-lyase from *Proteus vulgaris*: kinetic and spectral properties. Biochemistry (Moscow). 2002;67(10):1189-96.
21. Bommarius B, Anyanful A, Izrayelit Y, Bhatt S, Cartwright E, Wang W, et al. A family of indoles regulate virulence and shiga toxin production in pathogenic *E. coli*. PLoS ONE. 2013;8(1):e54456.
22. Lee J, Attila C, Cirillo SL, Cirillo JD, Wood TK. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Microbial Biotechnology. 2009;2(1):75-90.
23. Lee J, Bansal T, Jayaraman A, Bentley WE, Wood TK. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. Applied and Environmental Microbiology. 2007;73(13):4100-9.

24. Lee J-H, Cho MH, Lee J. 3-indolylacetonitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Environmental Microbiology. 2010;13(1):62-73.

25. Lee J-H, Kim Y-G, Kim C-J, Lee J-C, Cho M, Lee J. Indole-3-acetaldehyde from *Rhodococcus* sp. BFI 332 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012;96(4):1071-8.

26. Minvielle MJ, Bunders CA, Melander C. Indole-triazole conjugates are selective inhibitors and inducers of bacterial biofilms. MedChemComm. 2013;4(6):916-9.

27. Scherzer R, Gdalevsky GY, Goldgur Y, Cohen-Luria R, Bittner S, Parola AH. New tryptophanase inhibitors: towards prevention of bacterial biofilm formation. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2009;24(2):350-5.

28. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

29. Phillips RS, Ghaffari R, Dinh P, Lima S, Bartlett D. Properties of tryptophan indole-lyase from a piezophilic bacterium, *Photobacterium profundum* SS9. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2011;506(1):35-41.

30. Phillips RS, Johnson N, Kamath AV. Formation *in vitro* of hybrid dimers of H463F and Y74F mutant *Escherichia coli* tryptophan indole-lyase rescues activity with L-tryptophan. Biochemistry. 2002;41(12):4012-9.

31. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. The Proteomics Protocols Handbook: Human Press; 2005.

32. Deeley MC, Yanofsky C. Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology. 1981;147(3):787-96.

33. Kamath AV, Yanofsky C. Characterization of the tryptophanase operon of *Proteus vulgaris*. Cloning, nucleotide sequence, amino acid homology, and in vitro synthesis of the leader peptide and regulatory analysis. Journal of Biological Chemistry. 1992;267(28):19978-85.

34. Martin K, Morlin G, Smith A, Nordyke A, Eisenstark A, Golomb M. The tryptophanase gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b: evidence for horizontal gene transfer. Journal of Bacteriology. 1998;180(1):107-18.

35. Yoshida Y, Sasaki T, Ito S, Tamura H, Kunimatsu K, Kato H. Identification and molecular characterization of tryptophanase encoded by *tna*A in *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology. 2009;155(3):968-78.

36. Isupov MN, Antson AA, Dodson EJ, Dodson GG, Dementieva IS, Zakomirdina LN, et al. Crystal structure of tryptophanase. Journal of Molecular Biology. 1998;276(3):603-23.

37. Ku S-Y, Yip P, Howell PL. Structure of *Escherichia coli* tryptophanase. Acta Crystallographica Section D. 2006;62(7):814-23.

38. Kudo H, Natsume R, Nishiyama M, Horinouchi S. Analysis of stability and catalytic properties of two tryptophanases from a thermophile. Protein Engineering. 1999;12(8):687-92.

39. Kawasaki K, Yokota A, Oita S, Kobayashi C, Yoshikawa S, Kawamoto S-i, et al. Cloning and characterization of a tryptophanase gene from *Enterobacter aerogenes* SM-I8. Journal of General Microbiology. 1993;139(12):3275-81.

40. Phillips RS, Gollnick PD. Evidence that cysteine 298 is in the active site of tryptophan indole-lyase. Journal of Biological Chemistry. 1989;264(18):10627-32.

41. Suzuki S, Hirahara T, Horinouchi S, Beppu T. Purification and properties of thermostable tryptophanase from an obligately symbiotic thermophile, *Symbiobacterium thermophilum*. Agricultural and Biological Chemistry. 1991;55(12):3059-66.

42. Snell EE. Tryptophanase: structure, catalytic activities, and mechanism of action. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 287-333.

43. Kiick DM, Phillips RS. Mechanistic deductions from multiple kinetic and solvent deuterium isotope effects and pH studies of pyridoxal phosphate dependent carbon-carbon lyases: *Escherichia coli* tryptophan indole-lyase. Biochemistry. 1988;27(19):7339-44.

44. Phillips RS, Richter I, Gollnick P, Brzovic P, Dunn MF. Replacement of lysine 269 by arginine in *Escherichia coli* tryptophan indole-lyase affects the formation and breakdown of quinonoid complexes. Journal of Biological Chemistry. 1991;266(28):18642-8.

45. Hirahara T, Suzuki S, Horinouchi S, Beppu T. Cloning, nucleotide sequences, and overexpression in *Escherichia coli* of tandem copies of a tryptophanase gene in an obligately symbiotic thermophile, *Symbiobacterium thermophilum*. Applied and Environmental Microbiology. 1992;58(8):2633-42.