DEVELOPING AND EVALUATING THAI STUDENTS' UNDERSTANDINGS OF BACTERIAL CONJUGATION AND PROTEIN PURIFICATION USING PRACTICAL WORKS

SOMKIAT PHORNPHISUTTHIMAS

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(SCIENCE AND TECHNOLOGY EDUCATION)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาและประเมินความเข้าใจของผู้เรียนไทยเรื่องการคอนจูเกชันของแบคทีเรียและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยบทปฏิบัติการ (DEVELOPING AND EVALUATING THAI STUDENTS' UNDERSTANDINGS OF BACTERIAL CONJUGATION AND PROTEIN PURIFICATION USING PRACTICAL WORKS)

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ 4637316 SCED/D

ปร.ด. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีศึกษา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D., อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D., พิณทิพ รื่นวงษา, Ph.D.

บทคัดย่อ

Streptomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในดินที่มีลักษณะเป็นเส้นใย สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิและเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ส่วนแรกของการวิจัยเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายพลาสมิด pIJ8600 จาก *E. coli* ไปยัง *S. rimosus* 593, R7 และ M4018 พบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้สปอร์ของ *S. rimosus* R7 และ M4018 งอกก่อนการคอนจูเกชัน คือ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 10 นาที ขณะที่เส้นใยของ *S. rimosus* 593 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ สามารถใช้เป็นผู้รับในการคอนจูเกชันได้ อาหารที่เหมาะสมสำหรับคอนจูเกชัน คือ Oxoid TSA ที่มี $MgCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ attachment site บนโครโมโซม (*attB*) พบว่า *S. rimosus* R7 มีลำดับเบสของ *attB* เหมือนกับ *S. rimosus* M4018 และ *S. avermitilis* ส่วนที่สองของการวิจัยเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน AtrA หลังการแปลรหัสใน *S. coelicolor* โดยทำโปรตีน AtrA ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni^{2+} affinity chromatography และวิเคราะห์ DNA binding activity ระหว่าง AtrA กับ *act*II-ORF4 ด้วยวิธี electrophoretic mobility shift พบว่า AtrA ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปหลังการแปลรหัสจาก *S. coelicolor* ไม่สามารถตรวจวัดได้ ส่วน AtrA ใน *E. coli* ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัส มีค่า DNA binding activity เท่ากับ 140.6 nM

จากการนำองค์ความรู้ในสองส่วนแรกของงานวิจัยมาใช้สร้างบทปฏิบัติการเรื่อง 'การคอนจูเกชันในแบคทีเรีย' และ 'การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์' และนำไปสอนในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายและระดับปริญญาตรี ตามลำดับ พบว่า เมื่อสอนด้วยบทปฏิบัติการก่อนบรรยายช่วยให้ผู้เรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายพัฒนาความเข้าใจเรื่องคอนจูเกชันของแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการสอนแบบบรรยายอย่างเดียวและการสอนแบบบรรยายก่อนทำปฏิบัติการ สำหรับการสอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยห้องปฏิบัติการเสมือนรุ่นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ช่วยให้ผู้เรียนสามารถสร้างมโนทัศน์ของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ดีกว่าการสอนด้วยรุ่นภาษาอังกฤษอย่างเดียว จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่า การสอนบทปฏิบัติการด้วยการสร้างองค์ความรู้ของคอล์ปและวินน์สามารถช่วยให้ผู้เรียนสามารถสร้างมโนทัศน์ทางชีววิทยาได้

206 หน้า.

DEVELOPING AND EVALUATING THAI STUDENTS' UNDERSTANDINGS OF BACTERIAL CONJUGATION AND PROTEIN PURIFICATION USING PRACTICAL WORKS

SOMKIAT PHORNPHISUTTHIMAS 4637316 SCED/D
Ph.D. (SCIENCE AND TECHNOLOGY EDUCATION)
THESIS ADVISORS: BHINYO PANIJPHAN, Ph.D.,
ARINTHIP THAMCHAIPENET, Ph.D., PINTIP RUENWONGSA, Ph.D.

ABSTRACT

Streptomyces are filamentous Gram-positive soil bacteria that can produce abundantly industrial secondary metabolites and enzymes. The first part of this research describes the appropriate condition for conjugal transfer of plasmid pIJ8600 from *E. coli* to *S. rimosus* 593, R7 and M4018. The suitable condition for pre-germination of spores of *S. rimosus* R7 and M4018 was the heat treatment at 40 ºC for 10 min. The mycelia without heat treatment can be used as recipients for the non-spore forming strain *S. rimosus* 593. The suitable conjugative media is Oxoid TSA containing 10 mM $MgCl_2$. The chromosomal attachment site (*attB*) of *S. rimosus* R7 is identical to those of *S. rimosus* M4018 and *S. avermitilis*. The second part of this study describes the nature of the post-translational modification of AtrA in *S. coelicolor*. This modification is brought about purifying the AtrA by Ni^{2+} affinity chromatography and analysing the DNA binding activity of complexes between AtrA and *act*II-ORF4 using electrophoretic mobility shift. DNA binding activity of AtrA after post-translational modification in *S. coelicolor* could not be detected. However, DNA binding activity in non-modification form from *E. coli* was 140.6 nM.

The knowledge from first two parts of this study were used to construct the practical works in 'bacterial conjugation' and 'protein purification' to teach at the senior secondary school and undergraduate levels, respectively. The findings showed that having a teaching lab before lecture can assist secondary school students to develop a better understanding of bacterial conjugation compared to teaching by lecture only and teaching lecture before lab. In teaching protein purification by using a virtual class, teaching with a Thai/English version can help undergraduates to have a better construction of the purification concepts than teaching with the English version only. From these findings, teaching in a practical hands-on way, by using Kolb's and Winn's constructivist learning models, is required for students to construct biological concepts.

KEYWORDS: BACTERIAL CONJUGATION / PROTEIN PURIFICATION / PRACTICAL WORK / EXPERIENTIAL LEARNING MODEL

206 P.