

ประกายฝัน อุบนบาล : การศึกษาหน้าที่และความสัมพันธ์ของเพอร์พลาสมิกเซนเซอร์โปรตีน
ไคเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (FUNCTION AND PROTEIN- PROTEIN
INTERACTION OF CHITIN CATABOLIC SENSOR/KINASE FROM *VIBRIO
HARVEYI*). อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา ชันแก้วหล้า, 76 หน้า

การศึกษานี้เป็นการศึกษาหน้าที่และความสัมพันธ์ของเพอร์พลาสมิกเซนเซอร์โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนเพอร์พลาสมิกของโปรตีนไคตินแคตาบอลิกเซนเซอร์/ไคเนสที่มีชื่อว่า *VhChiS*_SM และโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลไกลโคไลโกแซกคาไรด์ที่มีชื่อว่า *VhCBP* จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการทำงานของโปรตีน *VhChiS*_SM จะถูกควบคุมโดยโปรตีน *VhCBP* ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของโปรตีน *ChiS* และทำให้เกิดการแสดงออกของยีนส์ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายไคตินภายในเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งในระบบของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยโปรตีนจะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกตามความจำเพาะต่อนิกเกิลเรซิน การแยกตามความแตกต่างของประจุ และสุดท้ายเป็นการแยกตามขนาดของโปรตีน จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยนำโปรตีนที่บริสุทธิ์ฉีดเข้าไปในกระต่ายเพศเมียพันธุ์ White- New Zealand จำนวน 2 ตัว เพื่อให้สร้างโปรตีน *VhChiS*_SM และ *VhCBP* โพลีโคลนอลแอนติบอดี จากการทดลองพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีชนิด *VhChiS*_SM และ *VhCBP* มีความจำเพาะต่อโปรตีน *VhChiS*_SM และ *VhCBP* ตามลำดับ แต่ไม่พบความจำเพาะต่อโปรตีนชนิดอื่นจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีชนิด *VhCBP* มีความจำเพาะต่อโปรตีน *CBP* ที่มาจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 650 หลังจากการกระตุ้นด้วยไคติน จากการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน *VhCBP* และ *VhChiS*_SM ด้วยเทคนิค pull-down พบว่า *VhChiS*_SM ถูกชะออกมาพร้อมกับ *CBP* ที่มาจาก *V. harveyi* 650 อธิบายได้ว่าทั้งสองโปรตีนมีความสัมพันธ์กัน

สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนักศึกษา ประ: ๓๔๕
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [Signature]
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม [Signature]

PRAKAYFUN UBONBAL : FUNCTION AND PROTEIN- PROTEIN
INTERACTION OF CHITIN CATABOLIC SENSOR/KINASE FROM
VIBRIO HARVEYI. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PANIDA
KHUNKAEWLA, Ph.D. 76 PP.

CHITIN/ PERIPLASMIC SENSOR DOMAIN CHITIN/ CATABOLIC SENSOR/
KINASE

The periplasmic sensor domain of two-component chitin catabolic sensor/kinase from *Vibrio harveyi* (namely *VhChiS_SM*) is located in the periplasmic region and it-controls the gene expression involved in the chitin utilization system. The recombinant *VhChiS_SM* was highly expressed in the *Escherichia coli* strain BL21(DE3) express on the system and purified by Ni-NTA, anion exchange and gel filtration chromatography. The purified *VhChiS_SM* was proven to be a monomer of 36.5 kDa. A synthetic gene encoding *VhCBP* was used to produce a monomer of 61 kDa molecular mass. The purified proteins were used to successfully immunize two New Zealand white female rabbits to obtain anti-*VhChiS_SM* and anti-*VhCBP* polyclonal antibodies, and the *VhChiS_SM* and *VhCBP* polyclonal antibody were found to react strongly with *VhChiS_SM* and *VhCBP*, respectively. they did not cross-react with other *Vibrio* proteins. Furthermore, an anti-*VhCBP* antibody was also found to react strongly with native CBP in *V. harveyi* type strain 650 after induction. Pull-down assay was used to observe the interaction between *VhChiS_SM* and *VhCBP*, which shows that *VhChiS_SM* co-elute with the native *VhCBP*, indicating that they are endogenous binding partners.

School of Chemistry

Academic Year 2019

Student's signature Prakayfun

Advisor's signature Panida

Co-advisor's signature Khunkaewla