บทคัดย่อ

ในงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดยีนไคติเนสจากจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 โดยทำการเตรียมชิ้นของดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3IA ขนาด 3-8 kb และตรวจหายีนไคติเนสโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies เป็นตัวตรวจจับ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไคติเนส ด้วย SDS-PAGE และ immunoblotting ของชิ้นดีเอ็นเอที่นำเข้าสู่พลาสมิด pBluescript II KS(-) และแบคทีเรีย DH5α พบว่าโคลน GC1-GC6 ที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสเป็นองค์ประกอบ การทำแผนที่ดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลาย ๆ ชนิด พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส และพบว่าการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กลงเหลือ 7 กิโลเบส การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE การทำ immunoblotting และการหาแอคติวิตี้โดยใช้ไกลคอลไคติน (glycol-chitin) เป็นสับสเตรทแสดงให้เห็นว่ายีนไคติเนสที่สกัดได้สามารถสร้างโปรตีนขนาด 63 กิโลดัลตัน การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์บางส่วนพบว่า ลำดับนิวคลิโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 ที่ย่อยด้วย *Kpn*I มีความเหมือนกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนสเอ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* คือ 98.3%

Abstract

In this research we describe isolation of a chitinase gene from genomic DNA of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283. The 3-8 kb DNA sizes were prepared by digesting with *Sau*3AI and a chitinase gene was detected immunologically using anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies as a probe. SDS-PAGE and immunoblotting of all the generated DNA fragments, which were cloned into the pBluescript II KS(-) plasmid and transformed into DH5α host cells, suggested that clones GC1-GC6 carried a DNA insert containing a chitinase gene. Analysis of DNA mapping with different restriction enzymes suggested that clone GC6 carried a DNA insert of approx.10 kb. This insert was reduced to 7 kb when digested with *Kpn*I. As revealed by SDS-PAGE, immunoblotting, and chitinase assay on native PAGE using glycol-chitin as substrate, the *Kpn*I-digested DNA could express a 63-kDa protein, which highly corresponded to chitinase A isolated from *V. carchariae*. Partial nucleotide sequencing showed that nucleotide sequence of the isolated gene was 98.3% identical to that of *V. carchariae* chitinase A.