อนันต์ศักดิ์ ลุนจันทา : การโคลน ผลิต ตกผลึกและข้อมูลเบื้องต้นของการ X-ray ผลึกของดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสทนร้อนจาก *Pyrococcus furiosus* (CLONING, EXPRESSION, CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC DATA OF THE *Pyrococcus furiosus* THERMOSTABLE DNA POLYMERASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 94 หน้า.

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสทนร้อนจาก *Pyrococcus furiosus* หรือ *Pfu* ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส family B เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเติมเบสนิวคลีโอไทด์ในปฏิกิริยา PCR ได้แม่นยำที่สุดในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ในการศึกษากลไกและการควบคุมการเติมนิวคลีโอไทด์หรือความสามารถในการทนความร้อนสูงของเอนไซม์ในเชิงโครงสร้างโปรตีน จำเป็นจะต้องมีโครงสร้างของเอนไซม์นี้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า ยังไม่มีการวิจัยเพื่อหาโครงสร้างของเอนไซม์นี้ โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ โคลน ผลิต ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ตกผลึก และ นำเสนอข้อมูลทางด้านเอ็กซ์เรย์เบื้องต้นของเอนไซม์ *Pfu* ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส

ในผลการศึกษา ได้มีการโคลนยีนดีเอ็นเอโพลิเมอเรสจากจีโนมของ *P. furiosus* เข้าสู่ pSY5 พลาสมิด และผลิตโปรตีนใน *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS ในรูปแบบที่เป็น His_8-tagged *Pfu* ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส โดยมีความสามารถในการผลิต 38 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้มีการทำ โปรตีนให้บริสุทธิ์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งพบว่ามี relative activity 30,000 U ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และยังพบอีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตนี้ยังมีความคงทนต่อสภาพความร้อนที่ 97.5 °ซ เป็นเวลานานถึง 23 ชั่วโมงและมีความสามารถในการทำ PCR ได้สูงกว่าเอนไซม์ที่มีขายตามท้องตลาด อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ได้มีการสูญเสียความสามารถในการทำ PCR บ้างเมื่ออยู่ในสภาพความร้อนดังกล่าวข้างต้น

ในการตกผลึกโปรตีนนั้น ได้มีการกระบวนการทำแตกต่างกันสองกระบวนการ คือ ไม่มีการให้ความร้อนโปรตีนก่อนการตกผลึกและมีการให้ความร้อนก่อนการตกผลึก จากผลการศึกษานี้พบว่า โปรตีนชนิดไม่ได้ให้ความร้อนมีผลึกเดี่ยวเกิดขึ้นในสภาวะที่มี 12% (w/v) PEG1000, 200 mM ammonium phosphate (monobasic) และสามารถหักเหเอ็กซ์เรย์ ได้เพียงที่ 4 อังสตอร์ม เท่านั้น ส่วนโปรตีนชนิดให้ความร้อน ซึ่งมีผลึกเดี่ยวเกิดขึ้นในสภาวะ ที่มี 10% w/v PEG8000, 100 mM sodium acetate, and 50 mM magnesium acetate สามารถหักเหเอ็กซ์เรย์ได้ที่ 3 อังสตอร์ม โดยมี unit-cell parameter เป็น $a = 91.9$ Å, $b = 126.8$ Å, $c = 88.4$ Å, $\alpha = 90.0^{o}$, $\beta = 109.1^{o}$, and $\gamma = 90.0^{o}$ และ เป็นผลึกชนิด monoclinic

space group C2 โดยมี Matthew's coefficient เท่ากับ 2.64 $Å^3Da^{-1}$ และมี solvent content เท่ากับ 53.5% (v/v)

โครงสร้างโดยรวมของเอนไซม์ *Pfu* ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสนี้ ในเบื้องต้นประกอบด้วยโดเมนและซับโดเมนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ โดเมน N-terminal, Exonuclease และ Polymerase ซึ่งโดเมน Polymerase นี้ประกอบด้วย 2 ซับโดเมน คือ ซับโดเมน Palm และ Fingers โดยที่ไม่สามารถเห็นโครงสร้างของโดเมน Thumb นอกจากนี้ยังสามารถเห็นพันธะ disulfide Cys452-Cys466 และ Cys530-Cys533 ที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่างซับโดเมน Palm และ Fingers

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ANANTASAK LOONCHANTA : CLONING, EXPRESSION, CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC DATA OF THE *Pyrococcus furiosus* DNA POLYMERASE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 94 PP.

PFU DNA POLYMERASE/PYROCOCCUS FURIOSUS/CRYSTALLIZATION/ X-RAY DATA

The *Pyrococcus furiosus* thermostable DNA polymerase or *Pfu* DNA polymerase is structurally homologous to the family B DNA polymerases. It has been shown to have the highest fidelity, introducing the lowest amplification errors in PCR products. Nevertheless, the structure of *Pfu* DNA polymerase is unknown. Understanding of the structural mechamisms and control of its high fidelity, as well as its thermostability is therefore limited. The objectives of this study were to clone, express, and purify *Pfu* DNA polymerase, test its activity, crystallize it and generate the preliminary X-ray crystallographic data.

The DNA polymerase gene was cloned from *P. furiosus* genomic DNA into the pSY5 plasmid vector, and expressed in *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) pLysS as the His_8-tagged *Pfu* DNA polymerase with yield of 38 mg/L culture. The proteins was purified and tested for its activity. The relative activity is 30,000 U/mg protein. The His_8-tagged *Pfu* DNA polymerase was still stable when incubated at 97.5 ^{o}C for 23 h and has higher PCR efficiency than commercial *Pfu* DNA polymerase. Some loss of PCR efficiency occurred in the heat-treated protein.

Single crystals of non-heated His_8-tagged *Pfu* DNA polymerase were obtained from a condition containing 12% (w/v) PEG1000, 200 mM ammonium

phosphate (monobasic) and diffracted to a resolution limit of only 4 Å. On the other hand, single crystals of heated His_8-tagged *Pfu* DNA polymerase were obtained from 10% w/v PEG8000, 100 mM sodium acetate, and 50 mM magnesium acetate. The crystal diffracted to a resolution limit of 3 Å. The unit-cell parameters were determined as a = 91.9 Å, b = 126.8 Å, c = 88.4 Å, $\alpha = 90.0^{o}$, $\beta = 109.1^{o}$, and $\gamma = 90.0^{o}$ with the monoclinic space group of C2, which gave Matthew's coefficient of 2.64 $Å^3Da^{-1}$ and a solvent content of 53.5% (v/v).

The preliminary overall structure is basically composed of an N-terminal domain, Exonuclease domain, and Polymerase domain including the Palm and Fingers subdomains. The Thumb domain is absent in the structure. Two disulfide bonds are found in the connection site between the Palm and Fingers subdomains of the structure: Cys452-Cys466 and Cys530-Cys533.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2006 Advisor's Signature_____