ชนิดา กุประดิษฐ์ : การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้นจากวัว
(BOVINE ENTEROKINASE LIGHT CHAIN CLONING AND PRODUCTION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 156 หน้า.

เอนเทอโรไคเนสเป็นเอ็นไซม์จำพวกซีรีนโปรติเอสซึ่งจะตัดพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ของตำแหน่งตัดจำเพาะ (Asp_4Lys) และเนื่องจากเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสามารถทำงานได้ในสภาวะที่หลากหลาย จึงทำให้เอนเทอโรไคเนสมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ตัดฟิวชันโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้นในระบบรีคอมบิแนนท์ (rEK_L) จากลำไส้วัว

จากการเพิ่มจำนวนดีเอนเอของยีนเอนเทอโรไคเนสสายสั้น (EK_L) จากลำไส้วัวและควายในประเทศไทยโดยเทคนิค RT-PCR และ nested PCR พบว่า ผลิตภัณฑ์ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาด 708 เบส และทำนายลำดับกรดอะมิโนได้ 235 กรดอะมิโน ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากควายที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน EK_L จากวัวที่มีการรายงานจากงานวิจัยที่ผ่านมา และพบว่ากรดอะมิโนของยีน EK_L จากวัวในประเทศไทยมีความแตกต่างเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ในขั้นตอนการชักนำยีน EK_L จากวัวที่ได้นี้ให้เกิดการแสดงออกและทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิพบว่า rEK_L ที่ผลิตในระบบโปรคาริโอตไม่สามารถทำงานได้ แต่ rEK_L ที่ได้จากการผลิตในระบบยูคาริโอตโดยใช้ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ Y11430 สามารถทำงานได้และสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์นี้ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยง *Pichia* ในถังหมักในช่วงที่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอ็นไซม์นี้ในระบบรีคอมบิแนนท์ด้วยเมธานอล ในระหว่างกระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกนั้นพบว่า การผลิตเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิต่ำนั้นไม่สามารถปรับปรุงคุณภาพของเอ็นไซม์ที่ผลิตให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น แต่สามารถเพิ่มผลผลิตของโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์ได้ หลังจากสิ้นสุดกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิโดยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุพบว่า ความเข้มข้นของ rEK_L บริสุทธิที่ได้คือ 433 มิลลิกรัมต่อลิตรจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ rEK_L ที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของ rEK_L ที่บริสุทธิพบว่า rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีกิจกรรมเอ็นไซม์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ สำหรับความสามารถในการตัดฟิวชันโปรตีนที่มีตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ EK (Asp_4Lys) พบว่าเพียง 0.09 ไมโครกรัม ของ rEK_L ที่บริสุทธิซึ่งได้จากงานวิจัยนี้สามารถตัด 6 ไมโครกรัม สับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีนของ rice BGlu1-thioredoxin ได้มากกว่า 95 % เมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 ชั่วโมง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชันโปรตีนด้วย rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้และ

rEK_L ที่ผลิตขายตามท้องตลาดนั้นมีรูปแบบของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจล SDS-PAGE คล้ายคลึงกัน

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

CHANIDA KUPRADIT : BOVINE ENTEROKINASE LIGHT CHAIN CLONING AND PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 156 PP.

BOVINE ENTEROKINASE LIGHT CHAIN/CLONING/FUSION PROTEIN

Enterokinase is a serine protease which catalyzes the hydrolysis of peptide bonds at the C-terminal end of the specific cleavage site $(Asp)_4Lys$. It retains full activity in various reaction conditions, which makes it suitable for site-specific cleavage of fusion proteins. In this research, cloning and production of recombinant bovine enterokinase light chain (rEK_L) were achieved.

Thai bovine and buffalo EK_L gene amplification by RT-PCR and nested PCR produced 708 bp PCR products, which encoded 235 predicted amino acids. Only one amino acid mutation was found in the Thai bovine EK_L. The obtained protein sequence of Thai buffalo EK_L in this research was closely related to that previously reported for bovine EK_L. In the step of bovine rEK_L expression and purification, rEK_L active could be obtained from eukaryotic expression system using *Pichia pastoris* Y11430, but not in the prokaryotic system. The enzymatic activity was detected in the recombinant *Pichia* fermentor culture supernatant during the methanol production phase. Low temperature production did not improve the quality of rEK_L, but did increase the yield of recombinant protein. After ion exchange purification, 433 mg/L of purified rEK_L was obtained from fermentation under the low induction temperature condition. The properties of the obtained purified rEK_L were also observed. The enzymatic activity of rEK_L was reduced significantly at low pH. The ability of rEK_L to cleave a specific $(Asp)_4Lys$ site of rice BGlu1-thioredoxin fusion proteins showed that

more than 95% of 6 µg fusion protein was cleaved by 0.09 µg of the purified rEK_L in 21 h at 30°C. The products of cleavage of the fusion protein with commercial rEK_L and rEK_L from this research showed similar patterns on SDS-PAGE.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2006 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature _____