บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาหน้าที่ของโดเมนจับไคตินที่ปลายเอ็นของเอ็นไซม์ไคติเนส เอ ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *ChBD* ขนาด 372 bp ที่ถอดรหัสให้โดเมนจับไคตินเรียกว่า $ChBD_{VhChiA}$ ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 124 ตัว เข้าไปในพลาสมิด pETBlue-1 ได้เป็นผลสำเร็จ หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETBlue-1/$ChBD_{VhChiA}$ เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21Turner (DE3)pLacI พบว่าเซลล์ *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ปริมาณมาก หลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีสองขั้นตอนคือ Ni-NTA affinity chromatography ตามด้วย gel filtration chromatography ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ประมาณ 10 mg ต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ลิตร ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค CD spectroscopy และ FL spectroscopy พบว่า $ChBD_{VhChiA}$ มีโครงสร้างทุติยภูมิหลักเป็น β-rich ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างสามมิติที่ได้รายงานไว้แล้วและ $ChBD_{VhChiA}$ มีโครงรูปที่เหมาะสม การศึกษาคุณสมบัติการจับกับไคตินและไคโตซานด้วยเทคนิค polysaccharide binding assay พบว่าเอ็นไซม์ VhChiA และ $ChBD_{VhChiA}$ สามารถจับกับไคตินได้ทุกชนิดแต่ด้วยความสามารถในการจับที่ไม่เท่ากัน โดยเอ็นไซม์ทั้งโมเลกุลสามารถจับกับไคตินได้สูงกว่าโดเมนจับไคตินประมาณ 10 เท่า การที่ $ChBD_{VhChiA}$ จับกับไคโตซานได้น้อยมากแสดงให้เห็นว่าหมู่ฟังก์ชัน N-acetamido ที่ตำแหน่ง C_2 ของวงแหวนน้ำตาล GlcNAc มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสัมพรรคภาคการจับ การวิเคราะห์ค่าคงที่การแตกตัวของการจับ (K_d) แสดงสัมพรรคภาพของการจับของ $ChBD_{VhChiA}$ จากมากไปน้อยดังนี้ colloidal β chitin > colloidal α chitin > crystalline β chitin > crystalline α chitin >> chitosan นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ด้วย 1H-15N HSQC NMR spectroscopy แสดงให้เห็นว่า $ChBD_{VhChiA}$ ไม่มีสัมพรรคภาคต่อน้ำตาลสายสั้น โดยสรุปงานวิจัยครั้งนี้ได้ค้นพบว่า $ChBD_{VhChiA}$ มีหน้าที่จับกับไคตินสายยาวและหมู่ฟังก์ชัน C_2-*N*-acetamido บนหน่วยน้ำตาล GlcNAc เป็นตัวกำหนดสัมพรรคภาพในการจับของ $ChBD_{VhChiA}$ กับสายไคติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

In this study, we carried out functional characterization of the chitin binding domain of *Vibrio harveyi* chitinase A. The *ChBD* gene fragment of 327 bp encoded the chitin binding domain, namely $ChBD_{VhChiA,}$ with 124 amino acids was successfully cloned into pETBlue-1 expression vector. The construct pETBlue-1/*ChBD* was then transformed into *E. coli* BL21Turner(DE3)pLacI host cells. The transformed E. coli cells were shown to produce high level of the recombinant protein and after two-step purification using Ni-NTA affinity chromatography, followed by gel filtration chromatography, 10 mg of the purified protein per one liter of bacterial culture was obtained. Secondary structure analysis by CD spectroscopy and FL spectroscopy showed that the $ChBD_{VhChiA}$ domain is β-strand rich, corresponding to the 3D-structure reported previously and folded properly. Studies of binding properties using polysaccharide binding assay showed that both VhChiA and $ChBD_{VhChiA}$ bound to all tested chitin, but with different binding capacities. The intact enzyme exhibited the binding activity about 10 fold greater than that of the truncated domain. The $ChBD_{VhChiA}$ showed slight binding activity against chitosan, which reflected that the functional C2-N-acetamido groups on the GlcNAc rings are crucial for the binding affinity of this domain. Analysis of the binding dissociation constant (K_d) indicated the strength of the binding affinity of $ChBD_{VhChiA}$ following the order: colloidal β chitin > colloidal α chitin > crystalline β chitin > crystalline α chitin >> chitosan. In addition, the analytical results obtained from 1H-15N HSQC NMR spectroscopy showed that $ChBD_{VhChiA}$ had not affinity towards short-chain sugars. In conclusion, this research uncovered the physiological function of the chitin binding domain of VhChiA to be responsible for interacting with long-chain chitin and the C_2-*N*-acetamido functionality on the GlcNAc units determines the affinity of binding between the $ChBD_{VhChiA}$ domain and the chitin chain.