มานะ ขาวเมฆ: ศึกษาการแสดงออกจากการโคลนเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านและการนำไปใช้ประโยชน์

(CLONING, EXPRESSION, AND USAGE OF CHITINASE FROM *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* DE WIT)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. เจมส์ อาร์ เกตุทัต-คาร์นส์, 195 หน้า. ISBN 974-533-049-3

เอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ต้นอ่อนกระถินบ้านมีมวลโมเลกุล 32 กิโลดาลตัน และค่า pI เท่ากับ 7.6 ซึ่งมีความคล้ายกันกับเอนไซม์ไคติเนส กลุ่มที่ 1 จากแหล่งต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีการศึกษาการโคลนไคติเนส ด้วยวิธีการตรวจจับไคติเนสจากห้องสมุดสารพันธุกรรมนิวคลีโอไทด์และวิธี 5' RACE พบสารพันธุกรรม 2 ชนิด ที่มีลำดับกรดอะมิโน 323 และ 326 ตัว กรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิด มีความเหมือนกันเอง 95% และมีความเหมือนกับไคติเนสจากถั่วแดงมากที่สุดถึง 74% นิวคลีโอไทด์ของกรดอะมิโน 326 ตัว ที่ปราศจากสัญญาณเปปไทด์ถูกนำมาแสดงออกในเซลล์แบคทีเรียที่รับเวคเตอร์ pET23d และ pET32a โปรตีนที่ได้จากเวคเตอร์ pET23d มีขนาด 32 กิโลดาลตัน ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในตัวเซลล์แบคทีเรีย ส่วนเวคเตอร์ pET32a จะผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาด 46 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยไทโอรีดอกซิน 14 กิโลดาลตันและไคติเนส 32 กิโลดาลตัน รีคอมบีแนนท์โปรตีนนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยนิเกิลเอ็นทีเอคอลัมน์และทำให้เป็นเอ็นไซม์ไคติเนสที่บริสุทธิ์โดยการตัดด้วยเอ็นเทอโรไคเนส ไคติเนสบริสุทธิ์ที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นเทอโรไคเนสมีมวลโมเลกุล 32 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 7.5 โดยมี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 4.5 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์นี้สามารถย่อยคอลลอยอัลดัลไคตินได้ดีที่สุด และจากการตรวจสอบชนิดของรีคอมบิแนนท์ไคติเนสพบว่าเป็นเอ็นโดไคติเนส มีค่า K_m และ k_{cat} ต่อการย่อยคอลลอยอัลดัลไคตินเท่ากับ 7.60 มิลลิกรัมแห้งของไคตินต่อมิลลิลิตรและ 8.28 ครั้งต่อนาที สำหรับพาราไนโตรเพนิลไตรอะซิติลกลูโคซามิไนด์เท่ากับ 48.78 ไมโครโมลาร์ และ 35.42 ครั้งต่อนาที และสำหรับเตตระอะซิติลไคโตเตตระโอสเท่ากับ 2.05 ไมโครโมลาร์ และ 95.22 ครั้งต่อนาทีตามลำดับ ในการทดลองการยับยั้งเชื้อราของรีคอมบีแนนท์โปรตีนพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 13 ชนิด

สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

MANA KAOMEK: CLONING, EXPRESSION, AND USAGE OF CHITINASE FROM *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* DE WIT

THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 195 PP. ISBN 974-533-049-3

Chitinase which was purified from *L. leucocephala* seedlings had a molecular weight of approximately 32 kDa and apparent pI of 7.6, similar to many class I chitinases. So cDNA were cloned using a combination of RT-PCR with homology-based 3′ RACE primers, λgt11 cDNA library screening and 5′ RACE to produce two closely related chitinase cDNA sequences. The derived chitinase precusor proteins (323 and 326 amino acids) exhibit 95% identity with each other and 74% identity with kidney bean chitinase precursor. The cDNA encoding a mature protein of 302 amino acids was expressed from pET23d and pET32a vectors in *E. coli* BL21 (DE3) and Origami (DE3), respectively. Induction of expression at 15°C resulted in an approximately 32 kDa protein from pET23d. The expressed protein was present in both insoluble inclusion bodies and soluble form. Using pET32a, the *E.coli* produced the recombinant protein of approximately 46 kDa, which contained 14 kDa of thioredoxin protein and 32 kDa of chitinase. It was purified using a Ni-NTA superflow column and was cleaved with enterokinase to produce free chitinase. The isoelectric point of free chitinase was 7.5. The enzyme showed an optimum pH of 4.5 and an optimum temperature 55°C. The best polysaccharide substrate was colloidal chitin. The recombinant chitinase displayed endochitinase like activities on *p*-nitrophenyl-triacetylchitotriose and the K_m and k_{cat} were 7.60 mg dry weight chitin/ml and 8.28 min^{-1} with colloidal chitin, 48.78 μM and 35.42 min^{-1} with *p*-nitrophenyl-*N,N′,N″*-triacetyl-chitotriose, 2.05 μM and 95.22 min^{-1} with *N,N′,N″,N‴*-tetraacetylchitotetraose respectively. The recombinant chitinase effectively inhibited growth of 13 fungal strains.

School of Biochemistry

Academic Year 2001

Student……

Advisor……...

Co-adivisor……..

Co-adivisor……..