บุษราคัม ป้อมทอง : การสร้างโปรตีนสายผสมและการศึกษาหน้าที่ของบีตากลูโคซิเดสและเอกโซบีตากลูคาเนสจากข้าว (RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASE AND EXO-β-GLUCANASE FROM RICE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. รจนา โอภาสศิริ, 208 หน้า

สารพันธุกรรมที่บรรจุรหัสทางพันธุกรรม (cDNA) สำหรับยีนของบีตากลูโคซิเดสไอโซไซม์ Os4bglu12 และ GH5BG ซึ่งจัดไว้ในไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่1 และ 5 ตามลำดับ ได้ถูกเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม cDNA ของ Os4bglu12 และ GH5BG ต่างบรรจุรหัสสำหรับสังเคราะห์กรดอะมิโนจำนวน 510 ตัว การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโนด้วยโปรแกรม PSORT คาดว่าโปรตีนทั้งสองนี้จะถูกส่งออกนอกเซลล์ โปรตีนสายผสมของเอนไซม์ Os4bglu12 และ GH5BG ซึ่งต่ออยู่กับโปรตีนไทโอรีดอกซินได้ถูกผลิตขึ้นใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami B(DE3) ในสภาพที่สามารถทำงานได้ เอนไซม์ Os4bglu12 สามารถย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส 3-5 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) และไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,3) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ น้ำตาลไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Os4bglu12 บีตากลูโคซิเดสในการย่อยสับสเตรตดังกล่าว เมื่อพิจารณาจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ GH5BG สามารถคาดคะเนได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีสองโดเมนประกอบด้วย เอกโซบีตา-(1,3)กลูคาเนสโดเมนและโดเมนที่คล้ายกับฟาสซิน ซึ่งไม่ค่อยพบในเอนไซม์ของพืชทั่วไป ถึงแม้ GH5BG จะจัดเป็นเอนไซม์เอกโซบีตากลูคาเนสที่ย่อยพันธะ β-(1,3) ในบีตากลูโคซิเดส แต่การทำงานของเอนไซม์นี้ในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์กับคล้ายกับบีตากลูโคซิเดสที่อยู่ในไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่1 เอนไซม์ GH5BG สามารถย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2-5 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) และไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,3) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ทั้งเอนไซม์ Os4bglu12 และ GH5BG ยังสามารถย่อยพาราไนโตรฟีนอลไกลโคไซด์ได้หลายชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณจับกับสับสเตรทตำแหน่งที่ -1 ของเอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อชนิดน้ำตาลที่เข้าจับต่ำ เอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถย่อยกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์และโพลิเมอร์ของกลูโคสที่มีกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β-(1,3) และโพลิเมอร์ของกลูโคสที่มีพันธะแบบ β-(1,3),(1,4) ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการถ่ายฝากยีนด้วยพาหะสี่ชนิด ได้แก่ pMDC83-*Os4bglu12*, pMDC139, pMDC139-*Os4bglu12* และ pMDC139-*GH5BG* เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ Yukihikari ด้วยการใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 คาดว่ามีต้นข้าวที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

ด้วยพาหะ pMDC139-*Os4bglu12* จำนวน 4 ต้น และ pMDC139-*GH5BG* จำนวน 3 ต้น ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการตรวจสอบด้วยการเพิ่มปริมาณของ 35 S โปรโมเตอร์ ด้วยวิธี PCR

สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

BUSARAKUM POMTHONG : RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASE AND EXO-β-GLUCANASE FROM RICE. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. RODJANA OPASSIRI, Ph.D. 208 PP.

β-GLUCOSIDASE/EXO-β-GLUCANASE/OLIGOSACCHARIDE/ RICE/ *AGROBACTERIUM*/TRANSFORMATION

The full-length cDNAs of a glycosyl hydrolase family (GH) 1 gene, *Os4bglu12* β-glucosidase, and a GH5 gene, *GH5BG* β-glucosidase, were cloned and characterized. The isolated *Os4bglu12* and *GH5BG* cDNAs each encoded a 510-amino-acid-long precursor protein that was predicted to be secreted outside the cells, as judged by the PSORT program. The recombinant thioredoxin-Os4bglu12 and -GH5BG fusion proteins were functionally expressed in *E. coli* strain Origami B(DE3). The recombinant Os4bglu12 enzyme efficiently hydrolyzed β-(1,4)-linked oligosaccharides of 3-6 glucose residues and β-(1,3)-linked disaccharide. Cellobiose could inhibit Os4bglu12 enzyme in the hydrolysis of cellooligosaccharides and laminaribiose. The mature protein of GH5BG contains two major domains, a β-1,3-exoglucanase-like domain and a fascin-like domain, which is not commonly found in plant enzymes. GH5BG was designated a putative glucan exo-β-(1,3)-glucosidase based on sequence homology, however, its catalytic activity is somewhat like GH1 β-glucosidases, which show similar oligosaccharide preferences. The GH5BG could hydrolyzed β-(1,4)-linked oligosaccharides of 2-6 glucose residues and β-(1,3)-linked disaccharide. Both Os4bglu12 and GH5BG also hydrolyzed many kinds

of *p*NP-β-glycosides which indicates the low stringency at the -1 subsite of the enzyme. Hydrolysis of β-(1,3)-linked oligosaccharides with DP more than 2, laminarin and 1,3, 1,4-β-glucans by both enzymes could not be detected.

Successful *Agrobacterium*-mediated transformation was obtained in Yukihikari calli with 4 different plasmids, pMDC83-*Os4bglu12*, pMDC139, pMDC139-*Os4bglu12* and pMDC139-*GH5BG*. Putative transgenic rice plants could be regenerated and specific PCR amplification of the 35S promoter indicated that 4 transgenic pMDC139-*Os4blu12* and 3 transgenic pMDC139-*GH5BG* plants were true transgenic rice plants.

School of Biochemistry
Academic Year 2007

Student's Signature_____
Advisor's Signature_____
Co-advisor's Signature_____
Co-advisor's Signature_____