ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์จากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์ ทีแอลเอส 33

ชื่อผู้เขียน นาย ธรรมรัตน์ ก้าวสมบัติ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ศิริรัตน์ สาระเวก กรรมการ
อ. ดร. ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์จากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TLS33 โดยตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI และนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ transform เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5α แล้วเลี้ยงบน Skim milk agar plate เลือกโคโลนีที่เกิดวงใสรอบโคโลนี และมีแอคทิวิตีสูงสุด มาศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่โคลนได้ โดย Cloned TLS33 เจริญเติบโตได้ดีที่เวลา 8 ชม และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดที่เวลา 12 ชม. มีอุณหภูมิและพีเอช ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 50-60 ^{0}ซ และ pH 5 และ 7 ตามลำดับ มีความคงทนต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 40^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ซึ่งต่างจากโปรติเอสที่ได้จาก Native strain ที่มีอุณหภูมิและพีเอช ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 70-80^{0}ซ และ pH 7 ตามลำดับ และมีความคงทนต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 75^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. Cloned TLS33 และ Native strain มีแอคทิวิตีของโปรติเอสภายนอกเซลล์มากกว่าภายในเซลล์เหมือนกัน โปรติเอสจาก Cloned TLS33 มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 65 kDa เมื่อหาขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE และมีขนาดประมาณ 118 และ 93 kDa เมื่อหาด้วยวิธี Zymography ชนิด SDS-PAGE และชนิด Native-PAGE ตามลำดับ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนมีขนาด 3,123 bp ประกอบไปด้วยยีนจำนวน 26 ยีนบนสายดีเอ็นเอ ลำดับเบสบางส่วนของ Clone TLS33 เหมือนกับลำดับเบสของ *Bacillus subtilis* เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

ได้ทำการ Subcloning ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก Cloned TLS33 เพื่อที่จะหาตำแหน่งของยีนโปรติเอสที่แท้จริง โดยตัดดีเอ็นเอสายผสมจาก Cloned TLS33 ด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco*RI แยกยีนโปรติเอส ออกจากดีเอ็นเอพาหะ โดย agarose gel electrophoresis และตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3AI นำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ transform เข้าไปในเซลล์ *Escherichia coli* DH5α แล้วทำการเลี้ยงบน Skim milk agar plate มี 2 โคโลนีที่เกิดวงใสรอบโคโลนี จึงได้นำทั้ง 2 โคโลนีมาศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสซึ่ง Subclone I และ Subclone II ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากสุดที่เวลา 24 ชม. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 50 ^{0}ซ และมีความคงทนต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 50^{0}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ใกล้เคียงกับโปรติเอสที่ได้จาก Cloned TLS33 โปรติเอสที่ได้จาก Subclone I, Subclone II, Cloned TLS33 และ Native strain มีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่พีเอช 7 เหมือนกัน Subclone I และ Subclone II มีแอคทิวิตีของโปรติเอสภายนอกเซลล์มากกว่าภายในเซลล์เหมือนกันกับ Cloned TLS33 และ Native strain มวลโมเลกุลของโปรติเอสจาก Subclone I และ Subclone II หาโดยวิธี SDS-PAGE ได้ประมาณ 14 kDa เหมือนกัน และจาก Zymography ชนิด SDS-PAGE และ Native-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 93 และ 68 kDa ตามลำดับ เหมือนกัน จึงสันนิษฐานได้ว่า Subclone I และ Subclone II มียีนโปรติเอสที่มีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ยีนโปรติเอสจาก Subclone I มีขนาดประมาณ 572 bp ประกอบไปด้วยยีนจำนวน 4 ยีนบนสายดีเอ็นเอ โดยที่ 1 ใน 4 ยีนนั้นเป็นยีนของเอนไซม์โปรติเอส และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลลำดับเบสของ GenBank พบว่า ลำดับเบสของ Subclone I ไม่เหมือนกับลำดับเบสที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank จึงสรุปได้ว่า ยีนโปรติเอสที่โคลนได้ไม่เหมือนกับยีนของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีผู้ศึกษาไว้

Thesis Title	Cloning of Extracellular Protease Gene from Thermophilic Bacteria Strain TLS 33
Author	Mr. Thammarat Kaosombat
M.S.	Biotechnology
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul — Chairman
	Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek — Member
	Lect. Dr. Dararat Tongkao — Member

Abstract

Extracellular protease gene from thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus* TLS33 was cloned by digesting the genomic DNA with *Sau* 3AI and ligating to vector pUC19 that was digested by *Bam* HI. Recombinant DNA was transformed into host cell *Escherichia coli* DH5α and the recombinant cells were grown on skim milk agar plate. Colony that produced clear zone and has highest protease activity was selected to study the characterisitics of the cloned protease. Cloned TLS33 had the optimum growth and secreted high protease activity at 8 and 12 h, respectively. It had optimum temperature and pH for protease activity at 50-60^{0}C and 5 and 7,respectively. Thermostabilities of protease from Cloned TLS33 was 40^{0}C at least 1 h which were different from the native strain protease that had optimum temperature and pH for activity at 70-80^{0}C and 7, respectively. Thermostabilities of the native strain protease was 75^{0}C at least 1 h.Cloned TLS33 and native strain had higher extracellular protease activity than the intracellular ones. The molecular weight of protease from Cloned TLS33 determined by SDS-PAGE , SDS-Zymography and Native-Zymography was estimated to be 65,118 and 93 kDa, respectively. The size of inserted DNA from Cloned TLS33 was estimated to be 3,123 bp which coded for 26 genes. Inserted DNA sequence of Cloned TLS33 was compared to GenBank database by

using BLAST program. It was shown that some part of the sequence was similar to the sequence of *Bacillus subtilis* .

Subcloning of the Cloned TLS33 was done to find the protease gene. The Insert DNA from Cloned TLS33 was digested with restriction enzyme *Hind* III and *Eco* RI. The inserted DNA was separated from the plasmid DNA by agarose gel electrophoresis and digested with *Sau* 3AI.Digested DNA were ligated to pUC19 which had been digested by *Bam* HI and transformed into *E.coli* DH5α. The recombinant cells were grown on skim milk agar plate and the 2 colonies producing clear zone were selected to study the characterisitics of the cloned protease. Subclone I and Subclone II secreted high protease activity at 24 h of cultivation. Subclone I and Subclone II had optimum temperature for protease activity and thermostability at 50^0C and 50^0C at least 1 h, respectively, these were similar to Cloned TLS33. Subclone I, Subclone II , Cloned TLS33 and native strain had the same optimum pH for protease activity at 7. Subclone I and Subclone II had higher extracellular protease activity than the intracellular one and same as Cloned TLS33 and native strain. The molecular weight of protease from Subclone I and Subclone II determined by SDS-PAGE , SDS-Zymography and Native-Zymography were estimated to be 14,93 and 68 kDa, respectively. Protease from Subclone I and Subclone II had the same molecular weight indicated that Subclone I and Subclone II had the same size of protease gene. The size of the inserted DNA from Subclone I was estimated to be 572 bp which coded for 4 genes and one of them was protease gene. Inserted DNA sequence of Subclone I was compared to GenBank. It was shown that the sequence was not similar to the other sequences of protease in GenBank database. It was sugested that protease gene from the cloning was not the same as the other bacterial protease genes which had been studied so far.