ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การโคลนและการแสดงออกของยีนไคติเนสที่แยกได้จาก *Beauveria bassiana* ใน *Escherichia coli*

ผู้เขียน นายทวี ดอนชัย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.เขมิกา สงแจ้ง

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างแมลง ดังนั้นจึงมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ไคติเนสเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช งานวิจัยนี้ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ใน *Escherichia coli* โดยนำยีน ไคติเนส (~1.1 kb) ที่เตรียมได้จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. bassiana* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ปลาย 5' และ 3' มีตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI และ *HInd*III มาใส่ในพลาสมิดเวคเตอร์ pSE420 ได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pDSM1 แล้วนำไปทรานสฟอร์มใส่ใน *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ด้วยการทำ DNA sequencing พบว่ายีนไคติเนสที่โคลนได้มีลำดับเบสที่ทำให้ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์เปลี่ยนไป 1 ตำแหน่ง แต่เป็นตำแหน่งที่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบระดับแอคติวิตีของไคติเนสระหว่าง recombinants และ non-recombinants โดยใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรท พบว่า recombinants มีระดับแอคติวิตีของไคติเนสมากกว่า non-recombinants ประมาณ 3 เท่า โดยพบระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงมากกว่าในสารสกัดจากเซลล์ แสดงว่ายีนไคติเนสที่โคลนได้เกิดการแสดงออกและเอนไซม์ไคติเนสถูกส่งออกนอกเซลล์มากกว่าในเซลล์ เมื่อศึกษาการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนไคติเนสใน recombinants ด้วย IPTG พบว่า IPTG สามารถเหนี่ยวนำให้ยีนไคติเนสเกิดการแสดงออกมากขึ้นกว่าเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Cloning and Expression of Chitinase Gene Isolated from *Beauveria bassiana* in *Escherichia coli*

Author Mr.Tawee Donchai

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Lect. Dr. Khemika Songjang

Abstract

Chitinase is an enzyme which degrades chitin, a major component of insect's structure. Therefore, chitinase is widely studied for insect pest control. This research aims to clone and express a *Beauveria bassiana* chitinase gene in *Escherichia coli*. The chitinase gene (~1.1 kb) was amplified from *B. bassiana* genomic DNA by PCR technique using designed primers to generate 5'-*Eco*RI and 3'-*Hind*III ends. The PCR product was then cloned into an expression vector pSE420 forming the recombinant plasmid, pDSM1 which was subsequently transformed into *E. coli* Top10. The nucleotide sequence of the cloned DNA was then investigated using DNA sequencing. The sequencing results showed nucleotide changes which alterated one amino acid residue. However, this change had no effect on chitinase activity. To study gene expression, the level of chitinase activity in recombinants was then compared with non-recombinant using colloidal chitin as a substrate. The results showed that the level of chitinase activity in recombinants was 3-fold higher than that in non-recombinants and supernatant had higher activity than cell extracts. This can be explained that cloned chitinase can be expressed and preferentially expressed as secreted protein. In addition, the induction of the chitinase gene expression by IPTG was also examined. The result demonstrated that the expression of cloned chitinase was elevated by IPTG.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved