กัลยกร วงศ์กาฬสินธุ์ : การโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สู่ *Escherichia coli* ด้วยระบบหลอมกับจีเอสทียีน (CLONING OF PROTEASE GENE FROM *Bacillus subtilis* TISTR25 TO *E. coli* BY GST GENE FUSION SYSTEM) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. นภา ศิวรังสรรค์,อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. วิไล อโนมะศิริ ; 114 หน้า. ISBN 974-637-122-3.

เมื่อโคลนโครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทยสามารถผลิตทั้งนิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอส เข้าสู่ *Escherichia coli* HB101 โดยอาศัยพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T ของระบบ GST Gene Fusion ทำให้เซลล์เจ้าบ้านสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein ทำการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยการเลี้ยงบนจานอาหารที่มีนมผงพร่องไขมัน IPTG และยาแอมพิซิลลิน การศึกษาด้วยวิธีโคโลนีไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามของยีนนิวทรัลโปรตีเอสที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี มีสัญญาณการไฮบริไดซ์ของยีนนิวทรัลโปรตีเอส เมื่อเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 97 ในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีซัคซิเนตเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 305.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในภาวะ pH 8.5 และการศึกษาผลของสารยับยั้งต่อความสามารถในการทำงานของโปรตีเอสพบว่าเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์ในภาวะที่มี EDTA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์แต่ยังคงมีแอคติวิตีอยู่เมื่ออยู่ในภาวะที่มี PMSF เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นการยืนยันว่าทรานสฟอร์แมนท์ผลิตโปรตีเอสชนิดนิวทรัลโปรตีเอส การทำให้ fusion protein บริสุทธิ์ สามารถทำได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงภายใน คอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีที่มีเจล glutathione Sepharose 4B แล้วแยก fusion protein ด้วยทรอมบิน ทำให้ได้โปรตีเอสอิสระที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงถึง 1,289.18 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ pH 8.5 ซึ่งสูงกว่าก่อนทำให้บริสุทธิ์ถึง 4.23 เท่า และเมื่อทำ SDS-PAGE พบว่าโปรตีเอสอิสระมีน้ำหนักประมาณ 44,000 ดาลตัน

ภาควิชา .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต กัลยกร วงศ์กาฬสินธุ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นภา ศิวรังสรรค์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิไล อโนมะศิริ