

เอนไซม์ไคตินเนสสามารถย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างแมลง ดังนั้นจึงมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ไคตินเนสเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช งานวิจัยนี้ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ใน *Escherichia coli* โดยนำยีนไคตินเนส (~1.1 kb) ที่เตรียมได้จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. bassiana* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ปลาย 5' และ 3' มีตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* มาใส่ในพลาสมิดเวกเตอร์ pSE420 ได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pDSM1 แล้วนำไปทรานสฟอร์มใส่ใน *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ด้วยการทำ DNA sequencing พบว่ายีนไคตินเนสที่โคลนได้มีลำดับเบสที่ทำให้ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์เปลี่ยนไป 1 ตำแหน่ง แต่เป็นตำแหน่งที่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบระดับแอกติวิตีของไคตินเนสระหว่าง recombinants และ non-recombinants โดยใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรท พบว่า recombinants มีระดับแอกติวิตีของไคตินเนสมากกว่า non-recombinants ประมาณ 3 เท่า โดยพบระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงมากกว่าในสารสกัดจากเซลล์ แสดงว่ายีนไคตินเนสที่โคลนได้เกิดการแสดงออกและเอนไซม์ไคตินเนสถูกส่งออกนอกเซลล์มากกว่าในเซลล์ เมื่อศึกษาการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนไคตินเนสใน recombinants ด้วย IPTG พบว่า IPTG สามารถเหนี่ยวนำให้ยีนไคตินเนสเกิดการแสดงออกมากขึ้นกว่าเดิม

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'-*EcoRI* and 3'-*HindIII* 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 altered 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.