ขวัญคณิศร์ อินทรตระกูล 2551: การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 ใน *Bacillus subtilis* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 87 หน้า


เอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายขนไก่ได้ดี จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการย่อยได้ของขนไก่ป่น เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ แต่เชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 มีการสร้างเมือกในระหว่างกระบวนการหมักทำให้ผลผลิตเอนไซม์ที่ได้ลดลง ดังนั้นจึงได้ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนเคราติเนสจากเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 เพื่อผลิตเซลล์ลูกผสมที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราติเนสสูง โดยโคลนยีนเคราติเนสจาก Genomic library โดยตัดโครโมโซมของ *B. licheniformis* KUB-K0006 แบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 ถึง 6 กิโลเบส เข้ากับพลาสมิด pHT43 ที่ตัดด้วย *Bam*HI และถ่ายโอนเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5$\alpha$ พบว่าโคลน e101 มีกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส 5.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากพลาสมิดไม่เสถียรจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบขนาดของยีนเคราติเนสได้ ส่วนการโคลนยีนเคราติเนสโดยทำ PCR cloning พบยีนเคราติเนสขนาด 1,140 คู่เบส ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล 99 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำนายโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 และเปรียบเทียบกับโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* MKU3, *B. licheniformis* RPk และ *B. licheniformis* PWD-1 โดยการสร้างโมเดลและการระบุตำแหน่งของบริเวณเร่งอ้างอิงจากเทมเพลท 1cseE และ 1bh6A ตามลำดับ พบว่ากรดอะมิโน Lue15, Arg249, Ala327 และ Ala376 ของเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ที่ต่างไปจากเอนไซม์เคราติเนสอื่นไม่ได้ส่งผลให้มีโครงร่างสามมิติของเอนไซม์ต่างกัน นอกจากนี้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ยังอยู่ที่ตำแหน่ง Asp137, His168 และ Ser325 เช่นเดียวกับเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล จึงทำนายได้ว่ายีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนและเกิดการม้วนพับเป็นโปรตีนเพื่อสร้างเป็นเอนไซม์เคราติเนสได้เช่นเดียวกับเอนไซม์เคราติเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงได้ทำการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *B. licheniformis* KUB-K0006 ใน *B. subtilis* 1A751 โดยใช้ pHT43 เป็นดีเอ็นเอพาหะ และจากการคัดเลือกโคลนด้วยการทำพีซีอาร์พบว่าทุกโคลนมียีนเคราติเนสอยู่ แต่โคลนไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสได้


ขวัญคณิศร์ อินทรตระกูล — ลายมือชื่อนิสิต

[signature] 23 / พ.ค. / 51 — ลายมือชื่อประธานกรรมการ