T136896

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้ได้นำ Green Fluorescence Protein (GFP) มาใช้เป็นแบบจำลองแทน Heterologous protein เพื่อใช้สำหรับศึกษาผลกระทบของเอนไซม์โปรติเอสต่อการสร้างและหลั่ง recombinant protein ในรา *A. oryzae* โดยสร้าง พลาสมิด pUTGFP2.5 ที่มี Secretion Signal Amino acid (ssa) ของ cellobiohydrolase I จาก *Trichoderma reesei* ต่อเชื่อมที่ N-terminal ของ *gfp* gene ที่ถูกควบคุมภายใต้การทำงานของ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) promoter ของ *A. nidulans* และส่งถ่ายพลาสมิด pUTGFP2.5 ร่วมกับ pOBT ที่มี phleomycin resistant gene เป็น selectable marker เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ *A. oryzae* สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และสายพันธุ์ที่บกพร่องต่อการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (U1638) และคัดเลือก transformants บนอาหาร Czapex Dox ที่มียา phleomycin เข้มข้น 125 μg/mL และ 200 μg/mL ตามลำดับ พบความถี่ของการเกิด tramsformant ของ *A. oryzae* WT และ U1638 บนอาหารที่มียา phleomycin ในอัตรา 34 และ 49 transformants/ 10^6 โปรโตพลาสต์/ 50 ไมโครกรัมพลาสมิด ตามลำดับ เมื่อนำ transformants ที่ได้ไปตรวจหา *gfp* gene โดยใช้วิธี Southern blot และ PCR พบว่าพลาสมิด pUTGFP2.5 สามารถแทรกเข้าไปรวมกับโครโมโซมของ transformants ทั้งสองสายพันธุ์ และพบการเรืองแสงสีเขียวของ GFP ของ transformant ทั้งสองสายพันธุ์ ภายใต้กล้อง fluorescence microscope transformant ทั้งสองสายพันธุ์มีความเสถียรในการผลิต GFP protein เป็น 100% หลังจากเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา phleomycin และ เมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิต GFP protein โดยนำ transformants ทั้งสองสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและหาค่า fluorescence intensities พบว่ารา *A. oryzae* U1638-GFP ผลิต extracellular GFP และ protease activity ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 ได้ 22.15 U/g cell และ 7.5 U/mL ตามลำดับ และที่เวลาเดียวกัน *A. oryzae* WT-GFP ผลิต extracellular GFP และ protease activity ได้สูงสุดเพียง 3.93 U/g cell และ 33 U/mL ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลกระทบของเอนไซม์โปรติเอสต่อการผลิต heterologous protein ของรา *A. oryzae* WT-GFP ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีการกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส (MSM medium) พบว่าปริมาณ extracellular GFP และเอนไซม์โปรติเอส ที่ชั่วโมงที่ 12 หลังย้ายลงใน MSM อาหารมีค่าเป็น 3.69 U/g cell และ 14.94 U/g cell ตามลำดับ ขณะที่เซลที่เจริญในอาหารที่มีสภาวะกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสด้วยกลูโคส (MSM+2% glucose) พบว่ามี extracellular GFP และ protease เป็น 10.49 U/g cell และ 0.74 U/g cell ตามลำดับ แสดงว่าการลดการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มผลผลิตของ heterologous protein ที่ผลิตในรา *A. oryzae* ได้ และเมื่อติดตามผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อการผลิต GFP ในรา *A. oryzae* WT-GFP พบว่าในอาหาร MSM ปริมาณของ GFP ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับเซลที่เจริญในอาหาร MSM+2% glucose แสดงว่า GFP สามารถถูกย่อยทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่ภายในเซล และพบว่าการส่ง GFP เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณส่วนปลายของ mycelium (tip) ของ *A. oryzae* แสดงว่า intracellular protease และ extracellular protease เป็นตัวจำกัดการผลิตและส่ง heterologous protein ออกนอกเซลในรา *A. oryzae*

คำสำคัญ (Keywords) : *Aspergillus oryzae* / Green Fluorescent Protein / Protein Secretion / Protease / Heterologous Protein

TE136896

Abstract

A reporter gene, green fluorescent protein (GFP) is used to study the effects of protease on recombinant protein production and secretion in *Aspergillus oryzae*. Plasmid pUTGFP2.5 was constructed by fusing a secretion signal sequence (ssa) of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I protein to N-terminal of *gfp* gene under the control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) promoter of *A. nidulans*. The plasmid pUTGFP2.5 and pOBT (conferring phleomycin resisitance gene) were used for co-transforming into *A. oryzae* for both wild type (WT) and protease deficient strains (U1638). Then transformants were selected on regeneration medium containing 125 μg/mL and 200 μg/mL of phleomycin, respectively. The transformation frequencies were 34 and 49 transformants/10^6 protoplasts/50 μg plasmid DNA, respectively. Southern bolt and PCR analysis were performed to determine the stability of *gfp* gene in host organisms. The result showed that *gfp* gene was found randomly integrated into the chromosome of both strains. Moreover, the fluorescent emission of GFP protein in both strains of transformants can also be detected by using fluorescence microscope. Transformants of WT-GFP and U1638-GFP were highly stable after many rounds of growth without selective pressure. To investigate the efficiency of GFP protein production, the total protease activity and fluorescence intensities of transformants were analyzed. The intensities of GFP and protease activity of protease deficient transformant strain (U1638-GFP) were found 22.15 U/g cell and 7.5 U/mL, respectively, after 60 hours of cultivation. EFU and protease activities of WT-GFP transformant strain are 3.96 U/g cell and 33 U/mL, respectively, after 60 hours of fermentation. After transferring *A. oryzae* WT-GFP into medium containing glucose, the production of protease was repressed to 0.74 U/g cell, resulting in the increase of the extracellular GFP intensity to 10.49 U/g cell. However, when transferring *A. oryzae* WT-GFP into the medium omitted of glucose, the protease production was increased to 14.94 U/g cell, and the extracellular GFP intensities was decreased to 3.69 U/g cell. In glucose starvation condition (MSM), proteases were probably responsible for the loss of intracellular GFP intensity and fluorescent was observed only at hyphal tip accumulation. It could be suggested that intracellular protease and extracellular protease were found to influence greatly to the yield of heterologous protein production in *A. oryzae*.

Keywords : *Aspergillus oryzae* / Green Fluorescent Protein / Protein Secretion / Protease / Heterologous Protein