

53401208 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : เมทิลพาราไรออนไฮโดรเลส/ยีน *mpdB*/การหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์

เมธีส สวนจันทร์ : การโคลนและการแสดงออกของยีน *mpdB* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยยาฆ่าแมลงเมทิลพาราไรออน โดยใช้พาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีน. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ , ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา และ อ.ดร.รุจิกาญจน์ นาสนิต. 125 หน้า.

ยาฆ่าแมลงเมทิลพาราไรออน (methyl parathion; MP) จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ในประเทศไทยมีการค้นพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถผลิตเอนไซม์เมทิลพาราไรออนไฮโดรเลส (methyl parathion hydrolase; MPH) โดยได้มีการโคลนยีน *mpdB* และทำการแสดงออกใน *E. coli* แต่อย่างไรก็ตามการได้มาซึ่งเอนไซม์ทำได้ยาก เนื่องจากข้อเสียบางประการของการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์ที่ได้จะอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และยังต้องการกระบวนการในการแตกเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตเอนไซม์ MPH โดยการหลั่งออกสู่ periplasmic space หรือสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการโคลนยีน *mpdB* เข้าสู่พลาสมิด pHisFlag-1 ซึ่งเป็นพาหะที่ออกแบบเพื่อการหลั่งโปรตีนออกสู่ periplasmic space ที่มีการเติมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สร้าง polyhistidine ซึ่งจะช่วยให้การแยกบริสุทธิ์โปรตีนและการแสดงออกใน *E. coli* จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MPH โดยวิธี microtiter plate MPH assay พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้มีการแสดงออกและผลิตเอนไซม์ MPH ที่สามารถย่อยสลาย MP ได้เป็นสีเหลืองของพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol; PNP) ทำการตรวจสอบความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์ MPH ที่หลั่งออกนอกเซลล์ โดยทดสอบบนอาหารแข็ง MP agar ที่มี MP พบว่าปรากฏสีเหลืองของ PNP รอบๆ โคลนี (yellow halo) ของรีคอมบิแนนท์โคลน แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ MPH ให้หลั่งออกนอกเซลล์ เอนไซม์ MPH ที่ได้จากส่วนของ periplasmic space และอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ cobalt column พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่า specific activity เท่ากับ 9.03 และ 3.44 U/mg ตามลำดับ และมีขนาดประมาณ 36 kDa ซึ่งเป็นขนาดของเอนไซม์ MPH ที่มีขนาดประมาณ 35 kDa รวมอยู่กับ polyhistidine-tag ที่มีขนาดประมาณ 0.84 kDa จากการวิเคราะห์ด้วย zymogram analysis ปรากฏแถบสีเหลืองของ PNP ที่ตำแหน่งของแถบโปรตีนขนาด 36 kDa จึงยืนยันได้ว่าแถบโปรตีนนั้นเป็น MPH จริง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.