ในงานวิจัยนี้ได้ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ ศึกษาลักษณะสมบัติ วิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน glycosyl hydrolase family 10 ในหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบยีน 2 ไอโซฟอร์ม (GHF10-*Pc*1 และ GHF10-*Pc*3) มีขนาด 1300 bp และ 1277 bp ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ไอโซฟอร์มมี open reading frame (ORF) ที่สมบูรณ์มีขนาด 1188 และ 1191 bp ตามลำดับ ซึ่งสามารถถอดรหัสให้โปรตีนที่มีขนาด 395 และ 396 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนมาเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่มีรายงานไว้พบว่าลำดับของกรดอะมิโนของยีนที่ได้มีความคล้ายกับยีนเซลลูเลสในหอย *Ampullaria crossean* 98% และ 82% ตามลำดับ และมีความคล้ายกับเซลลูเลสในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 10 (GHF10) จากการศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนพบว่า GHF10-*Pc*1 และ GHF10-*Pc*3 มีขนาด 4937 และ 4512 bp ประกอบด้วย 9 exon และ 8 intron ตามลำดับ จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในหอยเชอรี่ระยะต่าง ๆ เช่นไข่หอย และลูกหอยอายุ 1 และ 10 วัน พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนทั้งสองในระยะไข่หอย และพบว่ามีการแสดงออกของ GHF10-*Pc*1 ในลูกหอยระยะ 1 และ 10 วัน ส่วนยีน GHF10-*Pc*3 พบมีการแสดงออกในระยะ 1 วัน จากการศึกษาการแสดงออกของยีนเซลลูเลสใน *E. coli* โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG และวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่ามีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ในส่วน inclusion bodies ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ Ni-NTA column chromatography เมื่อวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาด 44 kDa ซึ่งเมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ endo-β-1,4-xylanase

207456

Project Code : MRG4980168

Project Title : Molecular cloning and expression of cellulase protein from golden apple snail (*Pomacea canaliculata*)

Investigator : Dr. Chanprapa Imjongjirak and
Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed

E-mail Address : chanprapa.i@chula.ac.th

Project Period : 1 July 2006 – 30 June 2008

Two cellulase cDNAs (GHF10-*Pc*1 and GHF10-*Pc*3) belonging to glycoside hydrolase family 10 (GHF10) were successfully isolated and characterized from stomach tissue of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*), a kind of herbivorous mollusca. Sequencing analysis revealed full-length cDNAs of 1300 and 1277 bp in length, respectively. The open reading frame (ORF) of cellulase cDNA was 1188 and 1191 bp, encoding 395 and 396 amino acid, respectively. Sequence alignment revealed that GHF10-*Pc*1 and GHF10-*Pc*3 shared high identity with glycosyl hydrolase family 10 (GHF10) and had an overall similarity of 98 and 82% to those of *Ampullaria crossean* cellulase EGX. A neighbour-joining tree showed a clear differentiation between each species and also indicated that GHF10-*Pc*1 and GHF10-*Pc*3 from *P. canaliculata* and *A. crossean* EGX are closely related phylogenetically. The genomic organization of cellulase GHF10-*Pc*1 and GHF10-*Pc*3 genes was also investigated. The GHF10-*Pc*1 and GHF10-*Pc*3 genes spanned over 4937 and 4512 bp, respectively. Both genes contained 9 exons interrupted by eight introns. The result verified the endogenous origin of the GHF10-*Pc*1 and GHF10-*Pc*3 genes. Analysis of RNA by RT-PCR from several ages of *P. canaliculata* revealed that neither gene was expressed in eggs. GHF10-*Pc*1 was also expressed in 1- and 10-day-old juvenile snails whereas GHF10-*Pc*3 was expressed only in 1-day-old juvenile snails. The result showed that two GHF10-*Pc* transcripts were developmentally expressed. The mature GHF10-*Pc*1 was cloned into the expression vector pET28b with an *N*-terminal hexa-histidine tag fused in-frame, and expressed in *E. coli* as inclusion body. The recombinant (r)GHF10-*Pc*1 was successfully purified by Ni-NTA chromatography. The purified rGHF10-*Pc*1 showed activity of endo-β-1,4-xylanase.