บทคัดย่อ

T 147299

ในโครงการวิจัยนี้ได้เริ่มจากออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จากนั้นนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์นี้มาใช้ในการทำ PCR โดยมีจีโนมิกดีเอนเอของ *Streptococcus zooepidemicus* เป็นแม่แบบ แยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป จากการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีนของไฮยาลูโรแนน ซินเทส (*has*A) ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น และได้ทำการวิเคราะห์โดย gene walking จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *has*A ซึ่งมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ 1.25 กิโลเบส สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส ซึ่งให้ชื่อว่า sz HAS โดยเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว (มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คำนวณได้คือ 47.77 kDa) โปรตีนนี้มี 2 putative transmembrane domain ที่ปลายอะมิโน และมี 2-3 transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล จากนั้นนำท่อนดีเอนเอของ *Streptococcus* ซึ่งมียีน *has*A มาเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR แล้วนำท่อนดีเอนเอที่ได้นี้มาเชื่อมต่อกับดีเอนเอพาหะสำหรับการแสดงออกคือ pET 28a (Invitrogen, USA) ได้เป็นพลาสมิด pHAS แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ *E. coli* BL 21 DE3, *E. coli* BL 21 (codon+) และ *E. coli* HMS 174 (DE3) pLysS ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนได้ใน *E. coli* BL 21 (codon+) แต่มีระดับต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากรหัสกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายกลุ่มอะมิโนของเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) เป็นรหัสที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* ดังนั้นจึงทำการดัดแปลงรหัสสำหรับกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโน อย่างไรก็ตามพบว่า *E. coli* นี้ถึงแม้จะมีพลาสมิด pHAS ที่ดัดแปลงรหัสแล้วและสามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส แต่ไม่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ดังนั้นน่าจะต้องมีการโคลนยีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกร่วมด้วย

Abstract

TE 147299

The cloning of hyaluronan synthase (HAS) gene of *Streptococcus zooepidemicus* (group C Streptococcus, GCS) was performed by the strategy of the polymerase chain reaction (PCR), using the design of degenerate oligonucleotides based upon conserved sequences from other organisms. The PCR product was isolated, and then characterized by DNA sequencing. The nucleotide sequence was determined and the deduced amino acid sequence was then compared with known HAS sequences. The amino acid sequence showed high similarity to other known HAS. In order to obtain the entire *has*A sequence, gene walking was performed. Sequence analysis indicated that *hasA* encode a protein; hyaluronan synthase, designated szHAS, 417-amino acids protein (calculated molecular mass, 47.77 kDa). The protein has two putative transmembrane domains at the amino terminus and 2-3 transmembrane domains at the carboxyl end. Streptococcus DNA fragment containing *has*A was amplified using PCR. The amplified fragment was incorporated into expression vector pET-28a (Invitrogen, USA). The pHAS, bearing the *has*A has been transformed into *E. coli* BL21 DE 3, *E. coli* BL 21 (codon+) and *E. coli* HMS 174 (DE3) plysS. The result showed that the *has*A could only express in *E. coli* BL 21 (codon+). However, the expression level was made in disappointingly small amounts. One factor influencing expression level might be the result of rare codon usage of some codons near the N-terminus of *has*A which could have severe effects on protein yield. Therefore, the rare codon modifications near the N-terminus of *has*A were performed. However, the *E. coli* host could not produce HA even if they contain the pHAS plasmid with the rare codon modifications and could produce hyaluronan synthase.