

Abstract

In this research, it aimed to focus on recombinant HBGase I, II, and III from *A. cerana indica* due to economic honeybees. In order to determine a pattern of expression, honeybees at different stages of development (eggs, larvae, pupae, and forager bees) were chosen. It showed that the highest expression of both *HBGase I* and *III* were in forager bees. The highest expression of *HBGase II* was in larvae and pupae but lower expression was found in forager bee together with no expression in eggs. At present, 3' end of *HBGase III* together with partial cDNA sequences of *HBGase I* and *II* at 942 and 834 bp were obtained. Considering the sequence homology, *HBGase I* was similar to the sequence of *A. cerana japonica* isozyme I (NM_AB260890.1) at 98% while *HBGase II* was similar to the sequence of *A. cerana japonica* isozyme II (NM_FJ752630.1) at 100%. The full length of *HBGase III* (1,704 bp) was cloned into pPICZ α A (an expression vector) and was transformed into *Pichia pastoris* GS115 (yeast). The expression of recombinant HBGase III was induced by 1% methanol after 144 hours (7 days). The obtained activity of secreted HBGase III was up to 6 U from the large scale culture (1.2 Liters). Also, pH activity, pH stability, and thermal stability of the enzyme were found out to be at 5.0, 4.5-7.5, and $<50^{\circ}\text{C}$, respectively. Considering substrate specificity, they were maltose and p-nitrophenyl α -D-glucoside (PNPG). In the future, kinetics of HBGase III will be obtained and recombinant clones of *HBGase I* and *II* will be expressed and characterized.

Key words: *Apis cerana indica*, α -glucosidase, *Pichia pastoris*, expression, recombinant enzyme

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นที่ recombinant HBGase I, II และ III จากฝัองโพรงไทย (*Apiscerana indica*) ซึ่งเป็นฝัองเศรษฐกิจอย่างหนึ่ง ในการตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของยีน ทำการเก็บตัวอย่างฝัองที่อยู่ในระยะการเจริญต่างๆ ได้แก่ ระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้และตัวเต็มวัย พบว่ายีน *HBGase I* และ *III* มีการแสดงออกสูงสุดในฝัองตัวเต็มวัยที่เป็นฝัองออกหาอาหาร ส่วน *HBGase II* มีการแสดงออกสูงสุดในฝัองระยะตัวอ่อนและดักแด้ แต่มีระดับการแสดงออกในระยะตัวเต็มวัยที่น้อยกว่าและไม่มีการแสดงออกเลยในระยะไข่ จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวเต็มสายของยีน ได้ส่วนปลายสายของ *HBGase III* ในส่วนของ *HBGase I* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่มีความยาว 942 bp และในส่วนของ *HBGase II* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่มีความยาว 834 bp เมื่อมาพิจารณาที่ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *HBGase I* มีความเหมือนกับยีนดังกล่าวของ *A. cerana japonica* isozyme I (NM_AB260890.1) ถึง 98% ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *HBGase II* มีความเหมือนกับยีนดังกล่าวของ *A. cerana japonica* isozyme II (NM_FJ752630.1) ถึง 100% ต่อมาทำการโคลน *HBGase III* (ความยาวของยีนเต็มสาย 1,704 bp) เข้าสู่ pPICZQA (ซึ่งเป็น expression vector) แล้วทำการ transform เข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* GS115 พบว่า recombinant *HBGase III* มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อถูก induce ด้วย 1% methanol เป็นเวลา 144 ชั่วโมง (7 วัน) ได้ activity ของ *HBGase III* ที่หลั่งออกนอกเซลล์ 6 U จากการเลี้ยงยีสต์ที่ 1.2 ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมี pH activity, pH stability, และ thermal stability ที่ 5.0, 4.5-7.5, และ $< 50^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ เมื่อมาพิจารณาที่ substrate specificity พบว่า maltose และ p-nitrophenyl α -D-glucoside (PNPG) เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุด

คำสำคัญ: ฝัองโพรงไทย แอลฟากลูโคซิเดส ยีสต์ การแสดงออกของยีน เอนไซม์แบบรีคอมบิแนนท์