

กรรมิกา ทองขาว 2552: การโคลน และการแสดงออกของยีน Salvicin K และ antimicrobial like bacteriocin β ของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:

อาจารย์เกียรติทิพย์ ชวงศ์โกมล, Ph.D. 120 หน้า

แบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ แบคทีเรียโอซิน Salvicin K (sal K) และ antimicrobial like bacteriocin β (alb β) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 ในลำไส้ของไก่ โดยพบว่า salvicin K และ alb β มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, Abp118 α และ Abp118 β ซึ่งจำแนกจากลำไส้ของมนุษย์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *L. sakei* และ *Leuconostoc* sp. การศึกษาการแสดงออกของยีน *active/sal K* และ *active/alb β* ใน *E. coli* โดยใช้พลาสมิด pGEX4T-1 ซึ่งเป็น glutathione-S-transferase (GST) fusion system pTYB1 และ pTYB12 ซึ่งเป็น intein fusion system ผลการทดลองไม่พบการแสดงออกของโปรตีน *active/sal K* เมื่อใช้ GST fusion system และพบการแสดงออกของโปรตีน *active/alb β* เมื่อใช้ GST fusion system แต่โปรตีนที่ได้มีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่ถูกต้อง เมื่อใช้ pTYB1 และ pTYB12 เป็น expression vector ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนที่มี *active/sal K* และพบการแสดงออกของโปรตีน *active/alb β* ที่มีแอกติวิตี เมื่อใส่ยีน *active/alb β* ไว้ทางปลายหมู่กรดอะมิโนของโปรตีนที่แสดงออก (pTYB1) โดยแบคทีเรียโอซิน *active/alb β* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และพบว่า เมื่อใส่ *active/sal K* และ *active/alb β* ไว้ที่ปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนที่มีการแสดงออก (pTYB12) ไม่พบว่าโปรตีนมีแอกติวิตี เนื่องจากการตกตะกอนของโปรตีน

ผลจากการทำ error prone PCR ของยีน *active/alb β* โดยใช้ pTYB1 เป็น expression vector พบว่าเกิดการกลายพันธุ์อย่างสุ่มบนยีน *active/alb β* และไม่พบการแสดงออกของโปรตีนเนื่องจากการไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนได้อย่างสมบูรณ์

Kannika Thongkhao 2009: Cloning and Expression of Salvicin K and Antimicrobial Like Bacteriocin β Genes of *Lactobacillus salivarius* K4. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Kiattawee Choowongkamon, Ph.D. 120 pages

Bacteriocin is an antimicrobial protein produced by bacteria to inhibit the growth of similar bacteria. Two isoforms of bacteriocins, Salvicin K (sal K) and antimicrobial like bacteriocin β (alb β), were identified from *Lactobacillus salivarius* K4 which was isolated from a chicken intestine. These bacteriocins are similar to the bacteriocins from *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 which was isolated from the human gastrointestinal tract, called Abp118 α and Abp118 β . These bacteriocins have the inhibiting activity against other lactic acid bacteria such as *Lb. sakei* and *Leuconostoc* sp. In this study, we reported the expression of sal K and alb β bacteriocin in *E. coli* using both the Glutathione-S-transferase (GST) fusion system (pGEX4T-1) and the intein fusion systems (pTYB1 and pTYB12). The results showed that the active sal K bacteriocin cannot be expressed in pGEX4T-1 expression vector and pTYB1 expression vector. The active alb β bacteriocin can be expressed in pGEX4T-1 expression vector but its amino acid sequence was incorrect. The active alb β bacteriocin can be expressed in the intein fusion protein and can inhibit *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T if the alb β bacteriocin was at the N-terminus of fusion protein (pTYB1). However, the fusion proteins that the sal K and alb β bacteriocin were at the C-terminus of fusion protein (pTYB12) were aggregated and had no activity.

For the error prone PCR experiment, the mutated of alb β bacteriocin were cloned into pTYB1 expression vector. The results showed that the randomly mutated *alb* β genes were can be generated. However, there is no protein expression on all isolated mutant plasmids. This may due to the no full-length of alb β bacteriocin was generated.