บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณลักษณะของยีนทรานสกลูตามิเนสในระดับโมเลกุล โดยการโคลนยีนทรานสกลูตามิเนสจากตับปลานิล ซึ่งผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทรานสกลูตามิเนส พบว่ายีนมีขนาด 2,493 หรือ 2,594 นิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับขนาดของส่วน 3' UTR ยีนส่วนที่ถูกแปลรหัสมีขนาด 2,091 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 696 ตัว จากลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความเหมือนกับทรานสกลูตามิเนสจาก ปลาจานแดงมากที่สุดคือ 78% ส่วนตัวเร่งประกอบด้วย Cys 272, His 332 และ Asp 355 ซึ่งเหมือนกับทรานสกลูมิเนสจาก ปลาจานแดง โดยบริเวณจำเพาะของทรานสกลูตามิเนส จากทั้งปลานิล และปลาจานแดงเหมือนกันคือ Cys 272 น้ำหนักโมเลกุลของทรานสกลูตามิเนสจากปลานิลที่ได้จากการคำนวณคือ 78.9 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.31 การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน *E .coli* โดยการโคลนรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสเข้าสู่ pET 32 (a) พลาสมิด และทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 20° C โดยการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนด้วย IPTG โปรตีนที่ถูกสกัดออกมาจากเซลล์ ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้หลักการ incorporation ของ fluorescence amine (monodansylcadaverine) กับ N, N' dimethylcasein ผลปรากฏว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสในการแสดงออกใน *E. coli* จึงทำการศึกษาในยีสต์ *P. pastoris* โดยการโคลน รีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสเข้าสู่ pPICZαB NH8 พลาสมิด และทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 20° C โดยการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนด้วย เมทานอล โปรตีนซึ่งผลิตออกมานอกเซลล์ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ผลปรากฏว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ทรานกลูตามิเนสทั้งในระบบการศึกษาใน *E. coli* และ *P. pastoris* โดยจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเนสใน host ที่เหมาะสมต่อไป

Abstract

The cDNA encoding transglutaminase from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver was cloned and sequence. The cDNA sequence consists of 2,493 or 2,594 nucleotides depend on the 3' UTR. The cDNA encodes an open reading frame of 2,091 nucleotides coding for 696 amino acids. The amino acid sequence of Nile Tilapia liver TGase showed highest identity of 78% with TGase from red sea bream. The catalytic triad of Nile Tilapia TGase consists of Cys 272, His 332 and Asp 355 similar to the red sea bream TGase. The putative active site Cys 272 of the enzyme was conserved between the two species. The calculated molecular weight of Nile Tilapia TGase is 78.9 kDa with an isoelectric point of 6.31. Recombinant Nile Tilapia TGase was cloned in to pET 32 (a) plasmid and expressed in *E. coli* at 20° C, induction with IPTG. The total protein was extracted from cell pellet then purified with Ni-column. TGase activity was assayed by incorporation of fluorescence amine (monodansylcadaverine) into N, N' dimethylcasein. The result shows that TGase activity was not found in *E. coli* so the expression system was changed to yeast system. Recombinant TGase was cloned in to pPICZαB NH8 and expressed in *P. pastoris* at 20° C, induction with methanol. Toal protein in the medium was purified and enzyme activity was assay. But the result show that TGase activity was not found, so recombinant TGase was not produced in neither *E. coli* nor *P. pastoris* system.