การแสดงออกของยีนไกลโคซิเลชั่นเอนไซม์ของคนในยีสต์

Expression of Human Glycosylation Enzyme Gene in Yeast

วรรณี ชยานันต์นุกูล

Wanne Chayanunnukul

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2541

Order Key 17771

BIB Key 152842

เลขหมู่ QH431 วว1 2541

เลขทะเบียน 4, มี.ค. 2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนไกลโคซิเลชั่นเอนไซม์ของคนในยีสต์

ผู้เขียน นางสาววรรณี ชยานันต์นุกูล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

Sialic acid ที่ปลายของสายโอลิโกแซคคาไรด์ของไกลโคโปรตีนมีหน้าที่สำคัญหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาทางชีวภาพ receptor binding และยืดอายุของไกลโคโปรตีนในร่างกาย เนื่องจากการผลิต recombinant glycoproteins จากยีสต์จะไม่มี sialic acid ดังนั้นการโคลนยีนของ Sialyltransferase จากคนเพื่อมาแสดงออกในยีสต์จะเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยในการแก้ปัญหา ยีนของ Sialyltransferase ขนาดประมาณ 1.34 กิโลเบสได้ถูกโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ 2 ชนิด คือ pPIC9 และ pPIC3.5 แล้วนำมาแสดงออกในยีสต์ ยีน Sialyltransferase ที่เข้าสอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ได้วิเคราะห์โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Southern blotting การแสดงออกของยีนชนิดนี้ได้วิเคราะห์โดยการหาอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Northern blotting พบว่ามีขนาด 1.9 กิโลเบส ปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase ที่ได้จากการแสดงออกของยีนได้ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.02 pmol/min/mg.protein ในน้ำเลี้ยงยีสต์ ST-pPIC9 ที่เหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการแสดงออก สำหรับยีสต์ ST-pPIC3.5 มีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.37 pmol/min/mg.protein ในไซโตพลาสซึม นอกจากนั้นเอนไซม์ Sialyltransferase ยังมีความสามารถในการย้าย fluoresceinyl-NeuAc เข้าสู่ไกลโคโปรตีนของยีสต์ ST-pPIC9 และยีสต์ ST-pPIC3.5 มีค่าเท่ากับ 20.85 และ 36.9 pmol/mg.protein ตามลำดับ

Thesis Title Expression of Human Glycosylation Enzyme Gene in Yeast

Author Miss. Wanne Chayanunnukul

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1998

Abstract

Terminal sugar, namely sialic acid in oligosaccharide of glycoprotein plays several important roles on glycoprotein function for example biological activity, receptor binding and prolong metabolic half-life. Since recombinant glycoproteins produced from yeast lack of sialic acid therefore manipulation of yeast cell to have ability to transfer sialic acid to glycoprotein whereby cloning of Sialyltransferase gene (ST) into yeast is one way to approach the problem. Human Sialyltransferase gene which is 1.34 kbs in length was cloned into two expression vectors; pPIC9 and pPIC3.5 then expressed in *Pichia pastoris.* The integrated Sialyltransferase gene in *Pichia pastoris* was detected by Polymerase Chain Reaction and Southern blotting. In addition, RNA of the enzyme gene in yeast analysed by Northern blotting was found about 1.9 kbs in length. The activity of Sialyltransferase enzyme in culture medium of *Pichia* ST-pPIC9 was 1.02 pmol/min/mg.protein, while the activity of the enzyme in cytoplasm of *Pichia* ST-pPIC3.5 was 0.37 pmol/min/mg.protein. Moreover, the Sialyltransferase enzyme in the cytoplasm of both *Pichia* ST-pPIC9 and *Pichia* ST-pPIC3.5 had the ability to transfer fuoresceinyl-NeuAc into the glycoproteins of the cells of yeast as 20.85 and 36.9 pmol/mg.protein, respectively.