การแสดงออกของขึ้นใกลโคซิเลชั่นเอนใชม์ของคนในยีสต์ Expression of Human Glycosylation Enzyme Gene in Yeast



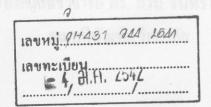
วรรณี ชยานันต์นุกูล Wanne Chayanunnukul

Master of Science Thesis in Biological Sciences
Prince of Songkla University

2541

Order Key 177711

BIB Key 152842



ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสคงออกของยืนไกลโคซิเลชั่นเอนไซม์ของคนในยืสต์

ผู้เขียน นางสาววรรณี ชยานันต์นุกูล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

Sialic acid ที่ปลายของสายโอลิโกแซกคาไรค์ของไกลโคโปรตีนมีหน้าที่สำคัญ หลายชนิด ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาทางชีวภาพ receptor binding และยืดอายุของใกลโค โปรตีนในร่างกาย เนื่องจากการผลิต recombinant glycoproteins จากยีสต์จะไม่มี sialic acid คังนั้นการโคลนยืนของ Sialyltransferase จากคนเพื่อมาแสดงออกในยืสต์จะ เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยในการแก้ปัญหา ยืนของ Sialyltransferase ขนาดประมาณ 1.34 กิโลเบสได้ถูกโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ 2 ชนิค คือ pPIC9 และ pPIC3.5 แล้วนำมาแสดง ออกในยีสต์ ยืน Sialyltransferase ที่เข้าสอดแทรกในโครโมโซมของยีสต์ได้วิเคราะห์ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Southern blotting การแสดงออกของ ขึ้นชนิคนี้ได้วิเคราะห์โดยการหาอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี Northern blotting พบว่ามีขนาด 1.9 กิโลเบส ปริมาณเอนไซม์ Sialyltransferase ที่ได้จากการแสดงออกของยืนได้ค่า ความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.02 pmol/min/mg.protein ในน้ำเลี้ยงยีสต์ STpPIC9 ที่เหนี่ยวนำให้อีสต์มีการแสดงออก สำหรับอีสต์ ST-pPIC3.5 มีค่าความ ว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.37 pmol/min/mg.protein ในไซโตพลาสซึม นอก จากนั้นเอนไซม์ Sialyltransferase ยังมีความสามารถในการย้าย fluoresceinyl-NeuAc เข้าสู่ใกลโคโปรตีนของยีสต์ 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

อัดคอาเพราะคณิสองศาสตรวดระด์ ดร. ออเรล็ตน์ สงศ์สารา อรรมการที่ปรึกษา

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 36.9 pmol/mg.protein, glycoproteins of the cells of yeast as 20.85 and respectively.