10 SEP 1999

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

EXPRESSION AND SECRETION OF GIANT CATFISH GROWTH HORMONE IN METHYLOTROPHIC YEAST *PICHIA PASTORIS*

PHUWADOL BANGRAK

With compliments
of
ฝ่ายหอสมุด ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 1999

ISBN 974-662-798-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P5774e
1999

311396 c.2

Copyright by Mahidol University

4036154 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING ; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : METHYLOTROPHIC YEAST/ *PICHIA PASTORIS*/ GIANT CATFISH GROWTH HORMONE/MFα–1/SECRETION

PHUWADOL BANGRAK: EXPRESSION AND SECRETION OF GIANT CATFISH GROWTH HORMONE IN METHYLOTROPHIC YEAST *PICHIA PASTORIS*. THESIS ADVISORS: LILY EURWILAICHITR, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., SOMCHAI PONGPATTANAKITSHOTE, Ph.D. 147 p. ISBN 974-662-798-8

The cDNA encoding mature giant catfish *Pangasianodon gigas* growth hormone (*gcGH*) was intracellularly and extracellularly expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, under the control of methanol inducible promoter (*AOX1*). A cassette for intracellular expression of gcGH containing the ACCATG (Kozak sequence) as a start codon was constructed. The level of intracellular expression of the recombinant gcGH (22 kDa) was approximately 80 mg/l of induction medium harvested after 6 days of induction period. For secreted expression, gcGH was fused to the N-terminal signal sequence of *Saccharomyces cerevisiae* α-mating factor. The accumulated gcGH in the induction medium was approximately 200 mg/l. N-terminal amino acid sequencing of the secreted product indicated the presence of three additional residues. The first two amino acids, glutamic acid and alanine, resulted from incomplete processing of the MFα-1 secretion signal, and glutamic acid was obtained from in-frame fusion of *gcGH* cDNA with *Pichia* expression vector. Two potential N-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) were observed in the gcGH. Thus, the glycosylation of the secreted gcGH was examined. The result from Endoglycosidase H treatment and glycoprotein staining revealed that, similar to the growth hormone from other species, recombinant gcGH produced from *P. pastoris* is not glycosylated.

Copyright by Mahidol University

4036154 MBMG/M : สาขาวิชา : อณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ; วท.ม.
(อณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์)

ภูวดล บางรักษ์ : การแสดงออกและการหลั่งออกนอกเซลล์ของฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึกในยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอล *PICHIA PASTORIS* (EXPRESSION AND SECRETION OF GIANT CATFISH GROWTH HORMONE IN METHYLOTROPHIC YEAST *PICHIA PASTORIS*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., สมชาย พงศ์พัฒนกิจโชติ, Ph.D. 147 หน้า. ISBN 974-662-798-8

ยีนที่สร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึก *Pangasianodon gigas* (*gcGH* cDNA) สามารถแสดงออกในยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอล *Pichia pastoris* ทั้งแบบภายในเซลล์และหลั่งออกนอกเซลล์ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX1* ระบบของการแสดงออกภายในเซลล์ของฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึกถูกสร้างขึ้นโดยประกอบด้วยลำดับเบสของ ACCATG (Kozak sequence) เป็นรหัสเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน จากการศึกษาพบว่าปริมาณการแสดงออกภายในเซลล์ของฮอร์โมนลูกผสมประมาณ 80 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารกระตุ้นการผลิต หลังจากกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยเมทานอลเป็นเวลา 6 วัน สำหรับการผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึกให้หลั่งออกนอกเซลล์ ทำได้โดยการเชื่อมต่อยีนที่สร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึกกับลำดับเบสที่ทำให้เกิดการหลั่งออกนอกเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (MFα-1) พบว่าปริมาณของฮอร์โมนที่หลั่งออกนอกเซลล์ประมาณ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารกระตุ้นการผลิต นอกจากนี้จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึกที่หลั่งออกนอกเซลล์ พบว่ามีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 3 ตัว คือ กรดกลูตามิคและอะลานีน ซึ่งเกิดการจัดการอย่างไม่สมบูรณ์ของลำดับเบสที่ช่วยให้เกิดการหลั่งออกนอกเซลล์ และกรดกลูตามิคซึ่งเป็นส่วนเกินที่ได้จากการเชื่อมต่อกันของยีนที่สร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึกกับดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการแสดงออกใน *P. pastoris* จากการศึกษาพบว่ามีตำแหน่งของการเติมหมู่น้ำตาล (Asn-X-Ser/Thr) 2 ตำแหน่งในยีนที่สร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของปลาบึก ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการเติมหมู่น้ำตาลของฮอร์โมนที่หลั่งออกนอกเซลล์ จากการทดลองโดยใช้ Endoglycosidase H และการย้อมสีไกลโคโปรตีน พบว่าฮอร์โมนลูกผสมที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* ไม่มีการเติมหมู่น้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

Copyright by Mahidol University