การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ใน Streptomyces spp.

นางสาว ยุวดี ตาลาวนิช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2537

ISBN 974-584-694-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17139910

Cloning and Expression of Glucose Isomerase gene from *Streptomyces* sp. strain 190-1 in *Streptomyces* spp.

Miss Yuwadee Talawanich

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-694-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 ใน *Streptomyces* spp.

โดย นางสาว ยุวดี ตาลาวนิช

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C326195 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: Streptomyces / GLUCOSE ISOMERASE / GENE CLONING
YUWADEE TALAWANICH : CLONING AND EXPRESSION OF GLUCOSE ISOMERASE GENE FROM Streptomyces sp. STRAIN 190-1 IN Streptomyces spp.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 85 pp.
ISBN 974-584-694-5

Glucose isomerase gene from Streptomyces sp. 190-1 was cloned in Streptomyces lividans TK21 using pIJ4090 as a cloning vector. Transformants were selected by thiostrepton resistibility. Clones having glucose isomerase gene were detected by colony hybridization with DNA probe. The DNA probe was prepared by Polymerase Chain Reaction (PCR) using chromosomal DNA of Streptomyces sp. 190-1 as template. The 24-mer oligonucleotide deduced from amino acid sequence of the glucose isomerase from Streptomyces sp. 190-1 and 23-mer oligonucleotide synthesized from conserved sequence of glucose isomerase gene found in various microorganisms were used as primers. However, the DNA probe showed non-specific binding, hence, positive clones with glucose isomerase gene could not be detected by this technique.

Plasmid pUR289, a recombinant plasmid containing glucose isomerase gene from Streptomyces sp. 190-1 cloned via E. coli system, was then used for subcloning. The 1.8 kb of DNA insert was ligated to pIJ4090 and transformed into Streptomyces sp. 190-1. The transformants were randomly checked for glucose isomerase activity. One clone, namely clone 19SL1, showed 2.15 units of glucose isomerase per mg of protein which was approximately 25% higher than that of Streptomyces sp. 190-1. Extraction of clone 19SL1 revealed the composition of 2 plasmids.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ยุวดี ตาลวานิช

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ยุวดี ตาลาวนิช : การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ใน Streptomyces spp. (CLONING AND EXPRESSION OF GLUCOSE ISOMERASE GENE FROM Streptomyces sp. STRAIN 190-1 IN Streptomyces spp.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 85 หน้า. ISBN 974-584-694-5

ได้ทำการโคลนยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก Streptomyces sp. 190-1 เข้าสู่ Streptomyces lividans TK21 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ4090 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์โดยอาศัยการต้านยาปฏิชีวนะไทโอสเตรพตอน และโคโลนีไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามซึ่งเตรียมโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ Streptomyces sp. 190-1 เป็นแม่แบบ ที่มี 24-mer นิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยยึดตามลำดับกรดอะมิโนด้าน N-terminal ของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของ Streptomyces sp. 190-1 และ 23-mer นิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก conserved sequence ของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดเป็นไพรเมอร์ จากการคัดเลือกพบว่าดีเอ็นเอติดตามไม่มีความจำเพาะ จึงไม่สามารถนำวิธีนี้มาคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรสได้

จึงได้นำยีนกลูโคสไอโซเมอเรสที่อยู่บนพลาสมิด pUR289 ที่ประสบความสำเร็จจากการโคลนในระบบ E. coli มาโคลนย่อยโดยเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pIJ4090 แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ Streptomyces sp. 190-1 นำทรานสฟอร์แมนท์มาสุ่มตรวจแอคติวิตีจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรส พบ 1 โคลนที่ให้แอคติวิตีสูงกว่า Streptomyces sp. 190-1 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 25% โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 2.15 หน่วย/มก.โปรตีน ให้ชื่อว่าโคลน 19SL1 และเมื่อสกัดพลาสมิดจากโคลน 19SL1 พบว่ามี 2 พลาสมิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ยุวดี ตาลาวนิช

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof. D.A. Hopwood แห่ง John Innes Institute, Norwich, U.K. ที่กรุณาเอื้อเฟื้อจุลินทรีย์ *Streptomyces lividans* TK21 และ S. *lividans* TK24 ที่มีพลาสมิด pIJ4090 ขอขอบพระคุณ Dr. Iain S. Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K. ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเรสทริกชันเอนไซม์บางส่วน

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้ใช้เครื่องมือ PCR ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตาม และคุณอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่ช่วยกรุณาสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการทดลองนี้

ขอขอบคุณ คุณรัชนี ไสยประจง ที่ให้เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR289 คุณปาหนัน เริงสำราญ ที่ช่วยผิกสอน ให้ข้อมูลและคำปรึกษาในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้องทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์ โทเร ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยบางส่วน โดยผ่าน รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษา

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ และญาติๆ ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 11

3. ผลการวิจัย 28

4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย 57

เอกสารอ้างอิง 65

ภาคผนวก 73

ประวัติผู้เขียน 85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปรียบเทียบระดับของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของเซลล์เจ้าบ้าน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวัดแอคติวิตี..... 29

2 ผลการสร้างและรีเจนเนอเรตโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 *Streptomyces* sp.Y1 และ *Streptomyces* sp.190-1..... 30

3 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ของ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.Y1..... 32

4 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp. Y1... 38

5 ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pIJ4090 ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เชื่อมแบบปลายทู่หรือปลายเหนียวเข้าสู่โปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces lividans* TK21 และ *Streptomyces* sp.190-1..... 50

6 เปรียบเทียบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส ที่จากโคลนที่สุ่มได้ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวัดแอคติวิตี 51

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรัคโตส โดยเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส.....	2
2	ภาพแสดงการจัดเรียงยีนของ *xyl* operon ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	8
3	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pIJ4090.....	9
4	ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ หรือ *Mbo*I แบบกึ่งสมบูรณ์ (Partial Digestion)..	34
5	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pIJ4090 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI.....	35
6	ภาพแสดงการตัดพลาสมิด pIJ4090 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมกันด้วยตัวเอง (self ligation) หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟต และแสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย T_4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล.....	36
7	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	40
8	การทำโคโลนีไฮบริไดเซชันของ *Streptomyces* sp.190-1 เซลล์เจ้าบ้านชนิดต่างๆ และทรานสฟอร์แมนท์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างได้.....	41
9	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUR289.....	43
10	แผนภาพแสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายทู่.....	45
11	ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมแบบปลายทู่.....	46
12	แผนภาพแสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว..	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

13 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มีชิ้นส่วนยีนกลูโคสไอโซเมอเรส โดยการเชื่อมแบบปลายเหนียว..... 48

14 แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์ต่างๆ..... 53

15 แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน 19SL1..... 54

16 ผลการตัดแถบดีเอ็นเอจากโคลน 19SL1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI... 55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
%	=	เปอร์เซนต์
ตร.ซม.	=	ตารางเซนติเมตร
λ DNA/*Hin*dIII	=	ดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจแลมด้า (λ) ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย