การแยกและศึกษาคุณสมบัติของฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแตนท์ ของ Klebsiella pneumoniae M5a1

นางสาว จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2526

ISBN 974 - 562 - 466 - 7

008642

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FORMIC DEHYDROGENASE MUTANTS OF *Klebsiella pneumoniae* M5a1

Miss Chutaphant Pinswasdi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

ISBN 974-562-466-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกและศึกษาคุณสมบัติของฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแทนท์ของ *Klebsiella pneumoniae* M5a1

โดย นางสาว จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินดากานต์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชยางกูร)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกและศึกษาคุณสมบัติของฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแตนท์ของ *Klebsiella pneumoniae*

ชื่อนิสิต นางสาว จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

ภาควิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2525

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่ถูกชักนำการถอดรหัสใน *Klebsiella pneumoniae* ขณะเมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เอนไซม์ตัวนี้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และอำนาจรีดิวส์ และมี 2 ฟอร์ม คือ ฟอร์ม H และฟอร์ม N เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ถูกชักนำด้วยฟอร์เมต ถูกกดคันด้วยไนเตรตและออกซิเจน เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ถูกชักนำด้วยไนเตรต ถูกกดคันด้วยออกซิเจน การทดลองนี้ได้แยกมิวแตนท์ที่อาจมีความผิดปกติที่เอนไซม์นี้ได้ 27 ตัว โดยใช้เบนซิลไวโอโลเจนเป็นเครื่องชี้ สามารถแบ่งมิวแตนท์ที่แยกได้เป็น 4 กลุ่มตามสีของโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเบนซิลไวโอโลเจนผสมอยู่และความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ได้เลือกมิวแตนท์ 3 สายพันธุ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่ากับไวล์ไทพ์ ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน มิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญได้ดีเท่ากับไวล์ไทพ์เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำและอาหารที่เสริมด้วยอาซีเตต เมื่อเสริมไนเตรตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไวล์ไทพ์จะเจริญได้ดีกว่ามิวแตนท์อย่างมีนัยสำคัญ สามารถตรวจสอบไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของไวล์ไทพ์ได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโต ส่วนมิวแตนท์นั้นจะทดสอบได้เมื่อเจริญถึงระยะ stationary phase แล้ว คลอเรตซึ่งเป็นแอนาลอกของไนเตรตสามารถยับยั้งการเจริญของไวล์ไทพ์ได้ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของมิวแตนท์ทั้ง 3 มิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถใช้ฟูมาเรตเป็นสารตั้นตอคาร์บอนได้เช่นเดียวกับไวล์ไทพ์ เมื่อเติบโตภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน เมื่อไวล์ไทพ์เติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน จะตรวจสอบก๊าซได้ 2 ชนิด คือคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ส่วนมิวแตนท์ทั้ง 3 เมื่อเติบโตในสภาวะเดียวกันนี้ จะเจริญได้ต่ำกว่าไวล์ไทพ์และไม่มีก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น เมื่อนำเมมเบรนที่เตรียมจากเซลล์ของไวล์ไทพ์มาตรวจสอบ

แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส พบว่า แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดร-จีเนสฟอร์มH และฟอร์ม N มีค่าระหว่าง 331–895 และ 21–111 นาโนโมลของตัวรับอิเล็กตรอนต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ส่วนเมมเบรนที่เตรียมจากเซลล์ของมิวแตนท์ในลักษณะเดียวกันไม่แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ฟอร์มแต่อย่างใด ความผิดปกติที่ยีนของมิวแตนท์ทั้ง 3 แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีเปอร์เซนต์โคทรานสดักชันกับ mtl เท่ากับ 45 และ 15–24.

Thesis Title	Isolation and Characterization of Formic Dehydrogenase Mutants of Klebsiella pneumoniae M5a1.
Name	Miss Chutaphant Pinswasdi
Thesis Advisor	Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Academic Year	1982

ABSTRACT

Formic dehydrogenase is an inducible enzyme of Klebsiella pneumoniae under anaerobic growth. It catalyzes the conversion of formate to carbondioxide and reducing power. There are 2 forms of this enzyme: form H and form N. Formic dehydrogenase form H can be induced by formate and repressed by nitrate and oxygen. Formic dehydrogenase form N can be induced by nitrate and repressed by oxygen. By using benzyl viologen as an indicator, 27 mutants which might have a defect on this enzyme were isolated. These mutants can be classified into 4 groups according to their colony color on benzyl viologen plate and their ability to fix nitrogen. Three of them were selected for further characterization. It was found that these mutants can grow on glucose minimal medium aerobically as well as the wild type. Under anaerobic condition, the growth of these mutants was comparable to that of the wild type, when the cultivation was carried out in the glucose minimal medium and the medium supplemented with sodium acetate. When nitrate was supplemented to the medium as the final electron acceptor, the wild type culture showed significantly higher cell density than those of the mutants. Nitrite was detected in the wild type culture as early as the onset of the logarithemic phase whereas in the mutant

cultures, it was found in the late stationary phase. The nitrite accumulated in the wild type culture was therefore remarkably higher than those in the mutant cultures. The growth of the wild type was inhibited by the addition of chlorate while those of the mutants were not affected by the addition of this nitrate analog. These mutants can use fumarate as sole carbon source as well as the wild type if they were grown under hydrogen atmosphere. Carbondioxide and hydrogen were produced from the culture of wild type grown anaerobically on glucose minimal medium supplemented with sodium formate. When mutants were grown under the same condition, not only the cell density were significantly lower than that of the wild type but also hydrogen was not produced. The specific activities of both forms H and N of formic dehydrogenase from membranes prepared from wild type cells were in the range of 331 - 895 and 33 - 111 nanomoles of artificial electron acceptor min^{-1} mg. $protein^{-1}$, respectively. No corresponding activities of this emzyme were found in the prepared membranes of the mutants. The defect of the genes of these 3 mutants can be classified according to the percent cotransduction frequency with respect to mtl into 2 groups: the first one is 45 whereas the second varies 15 - 24.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้ให้ความกรุณาต่อผู้เขียนทุกด้าน ตลอดเวลาที่ผู้เขียนศึกษาในภาควิชาชีวเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์ ผู้ช่วย-ศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการตรวจสอบกาซด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟ

ขอบคุณศูนย์ซ่อมเครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้ยืมเครื่องดูดสูญญากาศตลอดการวิจัยนี้ ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับการสนับสนุนด้านทุนวิจัย

นอกจากนี้ ผู้เขียนขอบคุณสมาชิกทุกท่านของภาควิชาชีวเคมี สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยนี้

สารบัญ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ช
สารบัญ ..... ฌ
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญรูป ..... ฏ
คำย่อ ..... ฐ
บทที่
1. บทนำ 1
2. วิธีทดลอง
1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 15
2. จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง 16
3. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 16
4. การเก็บรักษาจุลชีพที่ใช้ในการทดลอง 17
5. การเตรียมสารละลาย 18
6. การแยกฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแทนท์ 19
7. การตรึงตำแหน่งยีนที่ผิดปกติโดยการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส 20
8. การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์จากการเจริญเติบโต 23
9. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส 24
3. ผลการทดลอง
1. การแยกมิวแทนท์ที่มีความผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์ 27
2. การจำแนกกลุ่มของมิวแทนท์ 27
3. สรีรวิทยาของมิวแทนท์กลุ่มที่ 1 31
4. แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส 55
5. การตรึงตำแหน่งยีนที่ผิดปกติ 63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

4. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 70

เอกสารอ้างอิง 84

ประวัติผู้เขียน 90

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกฟิโนไทพ์ของมิวแตนท์	29
2	การเกิดกาซของไวล์ไทพ์และมิวแตนท์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 7.6, 7.0, 6.6	32
3	ระยะแบ่งตัว 2 เท่าของแบคทีเรียเมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับค่าชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	35
4	การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับค่าที่มีฟูมาเรทเป็นสารต้นคอคาร์บอน	40
5	การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน	43
6	การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน และเสริมด้วยโซเดียมอาซีเทท 10 มิลลิโมลาร์	45
7	การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน และเสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์	48
8	แอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ของไวล์ไทพ์	60
9	เปรียบเทียบแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ระหว่างไวล์ไทพ์และมิวแตนท์	62
10	แอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของไวล์ไทพ์	64
11	เปรียบเทียบแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ระหว่างไวล์ไทพ์และมิวแตนท์	66
12	เปอร์เซนต์โคทรานสดักชันของ fdh กับ mtl	69

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กลูโคสเมตาลอลิสมในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของ *Escherichia coli*	6
2	การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นสารต้นกอคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน	34
3	การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นสารต้นกอคาร์บอนในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	36
4	การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นสารต้นกอคาร์บอนเสริมด้วยโซเดียมอาซีเตท ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	37
5	การเจริญของแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นสารต้นกอคาร์บอนเสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต	39
6	Growth Yield ของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	42
7	Growth Yield ของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตทในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	44
8	Growth Yield ของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสปริมาณต่าง ๆ กัน เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	46
9	การทดสอบการต้านคลอเรตของแบคทีเรีย	50
10	ปริมาณอนุมูลไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	54
11	ชนิดและปริมาณกาซที่เกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	56
12	แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ของไวล์ไทพ์	61
13	แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของไวล์ไทพ์	65

คำย่อ

ATP	=	Adenosine-t'-triphosphate
BSA	=	Bovine Serum Albumin
BV	=	Benzyl viologen
DCPI	=	Diclophenolindophenol
EDTA	=	Ethylenediaminetetrachloroacetate
FADH	=	Flavin adenine dinucleotide reduced form
m.o.i.	=	multiplicity of infection
mtl	=	mannitol
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form
NADP	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
NTG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PMS	=	Phenazine methosulphate