การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จาก *Streptomyces* sp.190-1 ใน *Escherichia coli*

นางสาว รัชนี ไสยประจง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2537

ISBN 974-583-846-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19155939.

Cloning and Expression of Glucose Isomerase Gene from *Streptomyces* sp.190-1 in *Escherichia coli*

Miss Ratchanee Saiprajong

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 974-583-846-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลน และ การแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จาก *Streptomyces* sp.190-1 ใน *Escherichia coli*

โดย นางสาว รัชนี ไลยประจง

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.ศิรินร สิทธิประณีต)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

รัชนี ไล่ยประจง : การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp.190-1 ใน *Escherichia coli* (CLONING AND EXPRESSION OF GLUCOSE ISOMERASE GENE FROM *Streptomyces* sp.190-1 IN *Escherichia coli* อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นทานิชการ, 94 หน้า. ISBN 974-583-864-2

ได้ทำการโคลนยีนกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก *Streptomyces* sp.190-1 ใน *Escherichia coli* HB101 โดยใช้พลาส์มิด pUC18 หรือ pUC19 เป็นพลาส์มิดพาหะจากการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มีไซโลส์และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน พบ 1 โคลน ที่มีความเส์ถียรให้ชื่อว่าโคลน 289 และรีคอมบิแนนต์พลาส์มิดที่ได้ให้ชื่อว่า pUR289 เมื่อนำ *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาส์มิด pUR289 หรือพลาส์มิด pUC18 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มีไซโลส์เป็นองค์ประกอบ พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์มีค่าเท่ากับ 27.9 และ 11.0 นาโนโมล/นาที/มก.ของโปรตีน ตามลำดับ เมื่อใช้ IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำในการส์ร้างเอนไซม์โดย *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาส์มิด pUR289 พบว่า มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 33.3 นาโนโมล/นาที/มก.ของโปรตีน

เมื่อทำการศึกษาขนาดของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป (inserted DNA) ในรีคอมบิแนนต์พลาส์มิด pUR289 วิเคราะห์โดยอะกาโรส์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส์ พบว่ามีขนาด 1.8 กิโลเบส์ จากการศึกษาแผนที่เรส์ทริกชัน (Restriction map) พบว่ามีตำแหน่งตัดจำเพาะของเรส์ทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI *Hind*III และ *Pst*I จากการทำโคลนย่อย พบว่าชิ้นส่วน *Hind*III-*Hind*III มีความจำเป็นต่อการแสดงออกของยีน (gene expression) ในขณะที่ชิ้นส่วน *Eco*RI-*Pst*I ไม่มีความจำเป็นต่อการแสดงออกของยีน และดีเอ็นเอขนาดเล็กสุดที่สามารถแสดงออกได้มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส์

จากการทำ southern blot hybridization พบว่า ชิ้นส่วน *Pst*I-*Xba*I ของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปสามารถไฮบริไดซ์กับโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 ที่ตัดด้วย *Bam*HI

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C326113 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: GLUCOSE ISOMERASE/ GENE CLONING/ *Streptomyces*
RATCHANEE SAIPRAJONG : CLONING AND EXPRESSION OF GLUCOSE ISOMERASE GENE FROM *Streptomyces* sp.190-1 IN *Escherichia coli*.
THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 94 pp.
ISBN 974-583-846-2

Glucose isomerase gene from *Streptomyces* sp.190-1 was cloned in *Escherichia coli* HB101 by using pUC18 or pUC19 as cloning vector. Ampicillin resistant transformants were selected on MacConkey agar base medium containing xylose as an inducer. One stable positive clone, namely clone 289, showing red colony which indicated the presence of glucose isomerase gene was obtained. The recombinant plasmid was designated as pUR289. Glucose isomerase activity of *E. coli* HB101 harboring pUR289 or pUC18 when cultivated in LB medium containing xylose were 27.9 and 11.0 nmol/min/mg of protein respectively. When *E. coli* HB101 harboring pUR289 was induced with IPTG, the specific activity of glucose isomerase was 33.3 nmol/min/mg of protein.

Size of the DNA insert in pUR289 was determined by agarose gel electrophoresis to be approximately 1.8 kb. Restriction map of the DNA insert from this recombinant plasmid indicated that it contained at least one restriction site for each of *Bam*HI, *Hind*III and *Pst*I. Subcloning experiments indicated that *Hind*III-*Hind*III fragment of the insert DNA was essential for gene expression whil *Eco*RI-*Bam*HI and *Eco*RI-*Pst*I fragments were not. The smallest size of the insert capable for gene expression was about 1.4 kb. Southern blot analysis revealed one perfect hybridized band between *Pst*I-*Xba*I fragment of the insert and *Bam*HI digested chromosomal DNA from *Streptomyces* sp.190-1.

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2536	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ลิทธิประณีต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการ ในการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Dr. Iain Hunter แห่ง University of Glasgow, U.K. และ Dr. Hidayuki Suzuki แห่ง University of Kyoto, Japan ที่เอื้อเฟื้อให้เรสทริกชันเอนไซม์บางส่วนใช้ในการวิจัย และเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* HB101 และ *E. coli* SH50

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และ ข้อคิดเห็นในงานวิจัยนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบพระคุณ มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์ โทเร ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้บางส่วน โดยผ่าน รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษา

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ได้ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และ ญาติทุกท่าน และที่จะลืมขอบคุณมิได้ คือ น้องชาย และ คนใกล้ชิด ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสมอมา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญรูป..... ญ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 12

3. ผลการวิจัย..... 33

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย..... 66

เอกสารอ้างอิง..... 75

ภาคผนวก..... 83

ประวัติผู้เขียน..... 94

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์.....	42
2	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* HB101 ที่เตรียมด้วยรูบิเดียมคลอไรด์.....	43
3	เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR289 หรือ pUC18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี และไม่มี 0.2% ไซโลส เป็นองค์ประกอบ.....	51
4	เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR289 หรือ pUC18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53
5	เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR289 หรือ pUC18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ.....	54
6	ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากรูปที่ 16 วิเคราะห์หาแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289.....	56
7	ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากรูปที่ 17 วิเคราะห์หาแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289.....	58
8	เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR290 หรือ pUC19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	62

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

9 เปรียบเทียบระดับเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดย *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pUR290 หรือ pUC19 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ..... 63

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส และไซโลสไปเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสหรือไซโลสไอโซเมอเรส...	2
2	ปฏิกิริยาคาตาบอลิสม ของไซโลสไอโซเมอเรส.....	3
3	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19.....	8
4	เทคนิคคัดเลือกโคลนที่มียีนกลูโคสไอโซเมอเรส (positive clone) เมื่อใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านของ *E. coli* HB101 โดยเปรียบเทียบ *E. coli* SH50 (xyl^+) กับ *E. coli* HB101 (xyl^-), *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 และ pUC19 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน.....	34
5	ผลการย่อยโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp. 190-1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ Sau3AI หรือ *Mbo*I แบบกึ่งสมบูรณ์.....	36
6	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pUC18 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI.....	37
7	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pUC19 เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI.....	38
8	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสของพลาสมิดพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และแสดงรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase แล้วเทียบกับ DNA/*Hin*dIII.....	39
9	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสของพลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้วทดสอบการเชื่อมตัวเอง หลังจากกำจัดหมู่ฟอสเฟตแล้ว และแสดงรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมด้วย T4 DNA ligase แล้วเทียบกับ DNA/*Hin*dIII.....	40

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
10	การคัดเลือกโคลนที่รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรสเข้าไปจะให้โคโลนีสีแดง ในขณะที่โคลนที่ไม่ได้รับยีนกลูโคสไอโซเมอเรส จะให้โคโลนีสีขาวบน อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส และ 50 ไมโครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน.....	44
11	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสของพลาสมิดพาหะ กับ รีคอมบิแนนต์ พลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้เมื่อใช้ *E. coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้า บ้าน และ pUC18, pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ.....	45
12	รีทรานสฟอร์เมชัน (Re-transformation) ของ *E. coli* HB101 ที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ให้ 100% ของโคโลนีสีแดงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1% ไซโลส และ 50 ไม โครกรัม/มล. ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน.....	46
13.	แสดงโคโลนีสีแดงของโคลน 289 ที่คัดเลือกได้เทียบกับ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 pUC19 และที่ไม่มีพลาสมิดพาหะ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar base ที่มี 1%ไซโลส.....	48
14	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 เปรียบเทียบกับพลาสมิดพาหะ pUC18.....	49
15	การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอที่รับเข้าไป (inserted DNA) ของรีคอม บิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิเคราะห์ ผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบกับ DNA/*Hin*dIII....	50
16	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ตัด ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ.....	55
17	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 ที่ตัด ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ.....	57
18	แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289.....	59
19	โคลนย่อยของ pUR289 นำเข้าสู่ *E. coli* HB101 โดยมีพลาสมิดดี เอ็นเอพาหะ pUC18 หรือ pUC19 เป็นพาหะในการนำเข้า.....	61

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

20 ผลการทำ Southern blot hybridization ระหว่างโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Streptomyces* sp.190-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUR289 โดยใช้ชุดติดฉลากและตรวจสอบ enhanced chemiluminescence (ECL)ของ Amersham, U.K. 65

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

ซม. = เซนติเมตร

°ซ = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซนต์

λ DNA/*Hin*dIII = ดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจแลมด้า (λ) ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII