การโคลนยีนจากเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* สู่ *Escherichia coli* และคัดเลือกโคลนที่เสถียรคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดง

นางสาววิสาครี คงเจริญสุนทร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-504-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018796
I17125627

CLONING OF THE GENES FROM *Pseudomonas pseudomallei* AND SELECTION OF HEMOLYSIN-EXPRESSING *Escherichia coli*

MISS WISATRE KONGCHAROENSUNTORN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-504-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีนจากเชื้อ *Pseudomonas pseudomallei* สู่ *Escherichia coli* และการคัดเลือกโคลนที่แสดงคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดง
โดย	นางสาววิสาครี คงเจริญสุนทร
สหสาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประเสริฐ)

ที่อยู่ในเล่มนี้เป็นผลงานวิจัยของนิสิตเพื่อการศึกษาเท่านั้น

วิสาตรี คงเจริญสุนทร : การโคลนยีนจากเชื้อ Pseudomonas pseudomallei สู่ Escherichia coli และการคัดเลือกโคลนที่แสดงคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดง (CLONING OF THE GENES FROM Pseudomonas pseudomallei AND SELECTION OF HEMOLYSIN-EXPRESSING Escherichia coli) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สมหญิง ธัมวาสร, 63 หน้า. ISBN 974-583-504-8

Pseudomonas pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรค melioidosis คุณสมบัติที่คาดว่านาจะมีบทบาทในการก่อโรค ได้แก่ surface antigens และ extracellular substances พวก exotoxin, protease และ hemolysin

เพื่อที่จะศึกษา hemolysin ของ P.pseudomallei ได้ใช้ recombinant DNA technique โคลนดีเอ็นเอของ P.pseudomallei สายพันธุ์ K1/88 เข้าสู่ E. coli JM 109 โดยตัดดีเอ็นเอของ P.pseudomallei ด้วย PstI อย่างไม่สมบูรณ์แล้วนำมา ligate กับพลาสมิด pUC18 ซึ่งถูกตัดด้วย PstI และถูก dephosphorylated จากนั้น transform ligation mixture สู่ competent E. coli JM109 แล้วเพาะเลี้ยงบน amplicillin agar ที่มี X-gal เลือกโคโลนีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีของ transformants ที่มี recombinant plasmids นำ transformants ไปทดสอบหา hemolytic activity ด้วย cellophane plate technique พบ transformants ที่ให้ hemolytic activity 3 โคลน ซึ่งมี recombinant plasmids ที่ให้ชื่อว่า pWC3, pWC7 และ pWD1 โดยมี inserted DNA ขนาดประมาณ 0.9, 0.9 และ 5.6 kb ตามลำดับ เมื่อใช้ inserted DNA ทั้งสามเป็น probe ในการไฮบริไดซ์กับ Southern blots พบว่า inserted DNA สามารถไฮบริไดซ์กับ chromosomal DNA fragment ของ P.pseudomallei ที่ตัดด้วย PstI ที่ตำแหน่งเดียวกับ inserted DNA ยกเว้นกรณี inserted DNA fragment ขนาด 400 bp ของ pWC7 ที่ไฮบริไดซ์เป็น smear กับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง นอกจากนี้ยังพบว่า inserted DNA ของทั้ง 3 โคลน ไม่มี homology กัน

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

C346756 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: CLONING/Pseudomonas pseudomallei/HEMOLYSIN-EXPRESSING Escherichia coli

WISATRE KONGCHAROENSUNTORN : CLONING OF THE GENES FROM Pseudomonas pseudomallei AND SELECTION OF HEMOLYSIN-EXPRESSING Escherichia coli. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D. 63 pp.
ISBN 974-583-504-8

Pseudomonas pseudomallei is a gram-negative bacterium which is the causative agent of melioidosis. Properties which are implicated to contribute virulence to this bacterium are surface antigens, and extracellular substances such as exotoxin, protease and hemolysin.

In order to study the the hemolysin of P. pseudomallei, recombinant DNA techniques were employed to clone P.pseudomallei DNA into E. coli JM 109 via pUC18 cloning vector. Chromosomal DNA was partially digested with PstI restriction endonuclease and ligated with the dephosphorylated PstI site of pUC18 DNA. The ligation mixture was transformed into competent E. coli. Transformants were selected on ampicillin agar containing X-gal. These transformants were screened for the hemolytic activity by the cellophane plate technique. It was found that three E. coli transformants possessed hemolytic activity. These transformants harbored recombinant plasmids pWC3, pWC7 and pWD1 of which the inserts are approximately 0.9, 0.9 and 5.6 kb respectively. Southern blot analysis using these inserted DNA as probes demonstrated that P.pseudomallei DNA fragments of the same size with the probe hybridized to each probe except the 0.4 kb fragment of pWC7 which hybridized to higher molecular weight DNA of PstI digested P.pseudomallei. chromosomal DNA fragments. In addition, there was no homology among these inserted DNA.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแนวทางในการศึกษาวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขอุปสรรคและปัญหาต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่เสมอมาทำให้ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและประทับใจในความเมตตากรุณาเป็นอย่างยิ่ง

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสมใจ เหรียญประชูร หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ท่านได้กรุณาให้ความสำคัญกับงานวิทยานิพนธ์ และให้ความช่วยเหลือเกื้อกูลเป็นอย่างดี

อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

คณะกรรมการพิจารณาทุนโครงการผู้ช่วยวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย และฝ่ายวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

รายการตารางประกอบ.....ง

รายการรูปประกอบ.....จ

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์.....ช

บทที่

1. บทนำ.....1

วัตถุประสงค์.....2

2. การสำรวจเอกสาร

คุณสมบัติของ *Pseudomonas pseudomallei*.....3

Hemolysin ของ *P. pseudomallei*.....4

บทบาทของ hemolysin ในการก่อโรค.....5

การศึกษา hemolysin โดย recombinant DNA technique.....6

3. วัสดุและวิธีการ

การคัดเลือกแบคทีเรียที่นำมาศึกษา.....9

การโคลนยีนจากโครโมโซม.....9

การคัดเลือก *Escherichia coli* transformants.....13

การพิสูจน์โคลน.....13

4. ผลการทดลอง

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษา.....17

ผลการโคลนยีนจากโครโมโซมของ *P. pseudomallei*.....17

ผลการคัดเลือก *E. coli* transformant.....25

ผลการพิสูจน์โคลน.....25

5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....35
6. สรุปผลการวิจัย.....37
เอกสารอ้างอิง.....38
ภาคผนวก ก. 52
ข. 55
ค. 62
ประวัติผู้เขียน.....63

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas pseudomallei*.....10

2. แสดงผลการทดสอบหา hemolytic activity ของ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี cellophane plate techniques.....18

3. แสดงผลการตรวจสอบหา hemolytic activity ของ *Escherichia coli* transformants.....28

4. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ inserted DNAs ที่ได้จาก recombinant plasmids และค่า hemolytic activity ของ hemolysin-expressing *E. coli* 30

รายการรูปประกอบ

รูปที่ หน้า

1. แสดง Southern blot transfer.....15

2. แสดงช่วงค่าการดูดกลืนแสงของ chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 วัดโดย UV-visible recording spectrophotometer.....19

3. แสดงผลการตัด chromosomal DNA ของ *P. pseudomallei* สายพันธุ์ K1/88 แบบ partial digestion วิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis.....21

4. แสดงผลการตัดพลาสมิด pUC18 แบบ complete digestion วิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis.....22

5.1 แสดงโคโลนีของ *E. coli* JM109 ที่มี (pUC18) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม ampicillin และ X-gal.....23

5.2 แสดงโคโลนีของ *E. coli* JM109 ที่ได้ transform เอา recombinant plasmid เข้าไปในเซล บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม ampicillin และ X-gal.....24

6.1 แสดงผลการทดสอบหา hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technique ของ *P. pseucomallei* K1/88.....26

6.2 แสดงผลการทดสอบหา hemolytic activity โดยวิธี cellophane plate technigue ของ transformants ซึ่งมี recombinant plasmid pWD1.....27

7 แสดง recombinant plasmid จาก hemolysin-expressing *E. coli* ตัดด้วย PstI วิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis.....29

8.1 แสดง Southern blot analysis ของ PstI digested chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 และ inserted DNA จาก recombinant plasmids เมื่อใช้ inserted DNA จาก pWC3 เป็น probe.....32

8.2 แสดง Southern blot analysis ของ PstI digested chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 และ inserted DNA ของ recombinant plasmids เมื่อใช้ inserted DNA pWC7 เป็น probe.....33

8.3 แสดง Southern blot analysis ของ PstI digested chromosomal DNA fragments ของ *P. pseudomallei* K1/88 และ inserted DNA จาก recombinant plasmids เมื่อใช้ inserted DNA pWD1 เป็น probe.....34

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

°ซ	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
bp.	=	Base pair
BSA	=	Bovine serum albumin
cm	=	Centimeter
CTAB	=	Cetyltrimethyl ammonium bromide
dATP	=	Deoxyadenosine 5′-triphosphate
dCTP	=	Deoxycytidine 5′-triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine 5′-triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine 5′-triphosphate
dNTP	=	Deoxynucleotide 5′-triphosphate
d	=	dalton
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ddw	=	double distilled water
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
HEPES	=	N-2-Hydroxyethylpiperzine-N′-2-ethanesulfonic
HU	=	Hemolytic unit
kb	=	Kilobase
L	=	Liter
M	=	Molarity
mM	=	Millimolar
MW	=	Molecular weight
µg	=	Microgram
µL	=	Microliter
µm	=	Micrometer

µM	=	Micromolar
nm	=	Nanometer
ng	=	Nanogram
NaCl	=	Sodium chloride
NaH_2HPO_4	=	Sodium dihydrogen phosphate
Na_2HPO_4	=	Sodium hydrogen phosphate
N	=	Normality
NaOH	=	Sodium hydroxide
NSS	=	Normal saline solution
O.D.	=	Optical density
^{32}p	=	Radioactive Phosphorus 32
PIPES	=	Piperazine-N,N´-bis [2-ethanesulfonic acid]
PCR	=	Polymerase chain reaction
rpm	=	Revolution per minute
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SSC	=	Saline sodium citrate
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
U	=	Unit
UV	=	Ultraviolet
V	=	Voltage
V/V	=	Volume / Volume
W/V	=	Weight / Volume
X-gal	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside