การโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสจาก *Burkholderia cepacia*

นางสาวเกื้อการุณย์ ครูส่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-072-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I10107457

CLONING OF DNA FRAGMENT CONTAINING CHITINASE GENE FROM *Burkholderia cepacia*

Miss. Kuakarun Krusong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999
ISBN 974-334-072-6

Thesis Title	Cloning of DNA fragment containing Chitinase gene from *Burkholderia cepacia*
By	Miss.Kuakarun Krusong
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Rath Pichyangkura, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

.....Thesis Adivisor
(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Siriporn Sittipranee, Ph.D.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกื้อการุณย์ ครูส่ง: การโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสจาก *Burkholderia cepacia*
(Cloning of DNA fragment containing chitinase gene from *Burkholderia cepacia*),
อ.ที่ปรึกษา: อ.ดร.รัฐ พิชญางกูร, 101 หน้า. ISBN 974-334-072-6.

ไคติเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ของ N-acetylglucosamine ไคติเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แมลง พืช และสัตว์ *Burkholderia cepacia* ซึ่งแยกได้ในประเทศไทยสามารถผลิตไคติเนสได้ เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีเพื่อตรวจสอบไคติเนสแอคติวิตี พบแถบโปรตีนอย่างน้อยหนึ่งแถบที่มีไคติเนสแอคติวิตี ขนาด 47.5 กิโลดาลตัน สภาวะความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมของไคติเนสจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ไคติเนสสามารถย่อย colloidal chitin ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ glycol chitin flake chitin crab shells 78% deacetylated chitosan และ 90% deacetylated chitosan ตามลำดับ เมื่อนำดีเอ็นเอของโครโมโซม (chromosomal DNA) จาก *Burkholderia cepacia* มาตัดด้วย *Eco*R I *Bam*H I *Pst* I และ *Hind* III แล้วนำไปทำ Southern blot analysis โดยใช้ดีเอ็นเอตัวติดตาม CB1 ที่มีความจำเพาะต่อยีนไคติเนส family 18 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 7.0 กิโลเบส แถบดีเอ็นเอขนาด 7.8 และ 10 กิโลเบส และแถบดีเอ็นเอขนาด 1.2 และ 1.8 กิโลเบส เมื่อตัดดีเอ็นเอของโครโมโซมด้วย *Eco*R I *Bam*H I และ *Pst* I ตามลำดับ ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6 ถึง 9 กิโลเบสเมื่อตัดดีเอ็นเอของโครโมโซมด้วย *Eco*R I และแถบดีเอ็นเอขนาด 6 ถึง 12 กิโลเบสเมื่อตัดดีเอ็นเอของโครโมโซมด้วย *Bam*H I จึงถูกโคลนเข้าสู่ *E.coli* DH5α โดยใช้ pBluescript/KS$^+$ เป็นดีเอ็นเอพาหะ pKK243B สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอตัวติดตาม และเมื่อนำมาทำ Southern blot analysis ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 7.8 และ 1.8 กิโลเบส เมื่อตัดด้วย *Bam*H I และ *Pst* I ตามลำดับ โคโลนีของทรานสฟอร์แมนท์ที่มี pKK243B ให้วงใสรอบๆโคโลนี เมื่อเลี้ยงโคโลนีดังกล่าวบน LB-glycol chitin agar แล้วย้อมด้วย congo red และในน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-colloidal chitin ทรานสฟอร์แมนท์ที่มี pKK243B ให้ไคติเนสแอคติวิตี 33% เมื่อเปรียบเทียบกับไคติเนสแอคติวิตีจาก *Burkholderia cepacia* ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบส ที่ได้จากการตัด pKK243B ด้วย *Pst* I ถูกนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบ partial open reading frame ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 206 ตัว ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1-618 ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ putative sensor proteins (ข้อมูลจากธนาคารยีน) และ open reading frame ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 244 ตัว ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 618-1349 ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ putative 2-component transcriptional regulator ในที่นี้ เราไม่พบ open reading frame ใดในชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.8 กิโลเบสที่มีความคล้ายคลึงกับยีนไคติเนส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต เกื้อการุณย์ ครูส่ง

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4172229523 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: CHITINASE / *Burkholderia cepacia* / CLONING
KUAKARUN KRUSONG: CLONING OF DNA FRAGMENT CONTAINING CHITINASE GENE FROM *Burkholderia cepacia*, THESIS ADVISOR: RATH PICHYANGKURA, Ph.D., 101 pp. ISBN 974-334-072-6.

Chitinase (EC 3.2.1.14) is an enzyme that catalyzes the degradation of chitin, an insoluble β-1,4-linked polymer of N-acetylglucosamine. Chitinases are present in a wide range of organisms, including bacteria, insects, plants and animals. *Burkholderia cepacia,* isolated in Thailand, is capable of chitinase production. After SDS-PAGE and activity staining of culture medium, at least one band of chitinase activity, molecular weight 47.5 kDa, was detected. The optimum pH and temperature of crude enzyme were 7.0 and 40 °C, respectively. Chitinase hydrolyzed colloidal chitin the best, followed by glycol chitin, flake chitin, crab shells, 78% deacetylated chitosan and 90% deacetylated chitosan. Chromosomal DNA of *Burkholderia cepacia* was completely digested with *Eco*R I, *Bam*H I, *Pst* I and *Hin*d III and subjected to Southern blot analysis using a degenerate probe specific for family 18 chitinase gene, CB1. Southern blot analysis showed 7.0 kb band, 7.8 kb and 10 kb bands, and 1.2 kb and 1.8 kb bands when the chromosomal DNA was digested with *Eco*R I, *Bam*H I and *Pst* I, respectively. *Eco*R I digested DNA fragments between 6 to 9 kb and *Bam*H I digested DNA fragments between 6 to 12 kb were cloned into *E.coli* DH5α using pBluescript/KS$^+$ and screen for chitinase gene. pKK243B gave a positive signal on dot blot analysis when hybridize with CB1. Southern blot analysis of pKK243B showed 7.8 kb band and 1.8 kb band when pKK243B was digested with *Bam*H I and *Pst* I, respectively. Colonies containing pKK243B gave a clear zone around the colony when grown on LB-glycol chitin agar and stained with congo red. In cultured LB-colloidal chitin medium, transformant carrying pKK243B showed 33% of chitinase activity compared with activity from *Burkholderia cepacia* (100%). The 1.8 kb DNA fragment from *Pst* I digestion of pKK243B was sequenced. A partial open reading frame of 206 amino acid translated from nucleotide 1-618 and an open reading frame of 244 amino acid translated from nucleotide 618-1349 were found. The deduced amino acid sequences were compared with protein sequences in the Genbank Database. The partial open reading frame of 206 amino acid is similar to amino acid sequence of putative sensor proteins. The reading frame of 244 amino acid sequence shares homology with amino acid sequence of putative 2-component transcriptional regulator. No open reading frame which have similarity with chitinase gene was found in 1.8 kb *Pst* I fragment.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....เกื้อกูณย์ ครูส่ง.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

สถาบันวิทยบริการ

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Dr.Rath Pichyangkura, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Dr.Tipaporn Limpaseni, Dr.Anchalee Tassanakajon, and Dr.Siriporn Sittipranee for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

This work was partially supported by research grant from the Graduate school, Chulalongkorn University.

I wish to thank Dr.Sei-ichi Aiba for ethylene glycol chitin used in this work.

Sincere thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in Laboratory and discussion with sincerity and friendships. Special thanks are also extended to Pee Lek, Pee Jang, Pee Num, Pee Jun, Pee Toom, Ai, Aor, Paw, Ann and Ed for their kindness, willpower and suggestion.

My appreciation is also to Ms.Suneeporn Treesinnurak, Ms.Suppada Wittayapanpracha and Ms.Suchittra Chatpimolkul for their computer instruction.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my father, my mother, my brother Mr.Kuapol for their unlimited love, understanding and encouragement.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv
ENGLISH ABSTRACT v
ACKNOWLEDGEMENT vi
CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES x
ABBREVIATION xii
CHAPTER
I INTRODUCTION 1
II MATERIALS AND METHODS 25
2.1 Equipments 25
2.2 Chemicals 26
2.3 Enzyme and Restriction enzymes 27
2.4 Bacteria 27
2.5 Media Preparation 28
2.6 Cultivation of Bacteria 28
2.7 Enzyme assay 28
2.8 Protein Determination 29
2.9 Chitinase production of *Burkholderia cepacia* 30
2.10 Characterization of crude Chitinase 30
2.11 Extraction of Chromosomal DNA from *Burkholderia cepacia* 31
2.12 DNA Digestion by Restriction Enzymes 32
2.13 Agarose Gel Electrophoresis 32
2.14 Capillary Transfer of DNA to Nylon membrane 33
2.15 Labelling of degenerate probe specific for chitinase gene with [γ-^{32}P] 34
2.16 Southern Hybridization 34
2.17 Preparation of Plasmid by Rapid Alkaline Extraction . 34
2.18 DNA fragments for DNA Cloning 35
2.19 Ligation 36
2.20 Transformation 36
2.21 Detection of Chitinase Gene 37
2.22 Mapping of recombinant plasmid containing chitinase gene 38
2.23 Detection of chitinase activity in recombinant colonies 38
2.24 Analysis of Chitinase Gene 38

Page
III RESULTS 39
Chitinase production of *Burkholderia cepacia* 39
Characterization of crude chitinase 39
Detection of chitinase gene by Southern blot analysis 43
DNA Cloning 49
Detection of transformant containing chitinase gene 49
Determination of restriction sites of recombinant plasmid containing chitinase gene 50
Detection of chitinase activity in recombinant colonies 50
Analysis of chitinase gene 55
IV DISCUSSION 59
V CONCLUSION 73
REFERENCES 76
APPENDICES 82
APPENDIX A 83
APPENDIX B 89
APPENDIX C 92
APPENDIX D 93
APPENDIX E 94
APPENDIX F 95
APPENDIX G 96
APPENDIX H 97
BIOGRAPHY 101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1 Current practical uses of chitin, chitosan and their Derivatives 6
2 Comparison of the characteristics of purified chitinase From several microorganisms 15
3 Molecular cloning of chitinase genes 17
4 Hydrolysis of chitin and its related compounds with Chitinase 45
5 Chitinase activity in cultured LB-colloidal chitin medium .. 54
6 Comparison of the characteristics of chitinase from several microorganisms 60
7 Purification table of chitinase from *Burkholderia cepacia* .. 88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Chitin is a β-(1,4)-linked homopolymer of N-acetyl-D-Glucosamine	2
2	Simplified flowchart of preparation of chitin, chitosan and their oligomers from shellfish waste	4
3	Enzymes for the hydrolysis of chitin and chitosan	5
4	Comparison of family 19 chitinase mechanism (Scheme I), family 18 chitinase (Scheme III) ,and lysozyme (Scheme II) mechanism	8
5	A snapshot from the dynamics simulations of a tri-NAG oxocarbenium ion intermediate bound to barley chitinase	10
6	Residues that are involved in catalytic activity of chitinase A from *Serratia marcescens*	12
7	Residues that are involved in catalytic activity of hevamine, a plant chitinase	13
8	*Burkholderia cepacia* on colloidal chitin plate	40
9	Profile of chitinase production from *Burkholderia cepacia*	41
10	Effect of pH on chitinase activities	42
11	Effect of temperature on chitinase activities	44
12	Substrate specificity of crude chitinase from *Burkholderia cepacia*	46
13	SDS-PAGE of chitinase from *Burkholderia cepacia*	47
14	Detection of chitinase gene from *Burkholderia cepacia* by Southern blot analysis	48
15	Detection of chitinase gene from transformant containing pKK243B	51
16	Colonies containing pKK243B and pKK1.8PP on LB-glycol chitin plate stained with congo red	52
17	Restriction map of 7.8 kb insert fragment of pKK243B	53
18	Nucleotide sequence of 1.7 kb insert fragment of pKK1.8PP	56
19	Deduced partial amino acid sequence of putative sensor protein from pKK1.8PP	57
20	Deduced amino acid sequence of putative 2-component transcriptional regulator from pKK1.8PP	58
21	Structure of chitin and chitin related compounds	63
22	Conserved amino acid, FDGLDLDWEYP, was found in various organisms	65

Figure Page

23 Partial amino acid sequence alignment of putative sensor protein in various microorganism 68
24 Amino acid sequence alignment of putative 2-component transcriptional regulator in various microorganism 69
25 Restriction map of pCHI40..... 70
26 Proposed location of chitinase gene in 7.8 kb insert fragement of pKK243B 72
27 Profile of DEAE-cellulose column chromatography of chitinase, from *Burkholderia cepacia* at pH 7.6..... 85
28 SDS-PAGE of Chitinase from *Burkholderia cepacia*..... 87

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

A	Absorbance
bp	Base pair
cm	Centimetre
°C	Degree celcius
dATP	Deoxyadenosine 5′triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5′ triphosphate
dGTP	Deoxyguanidine 5′ triphosphate
dTTP	Deoxythymidine 5′ triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
hr	Hour
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	litre
M	Molar
µCi	Microcurie
µg	Microgram
µl	Microlitre
mg	Milligram
ng	Nanogram
min	Minute
rpm	Revolution per minute
% T	% Transmission

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย